

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID
FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS
Departamento de Química Analítica



TESIS DOCTORAL

**Nuevas estrategias de espectrometría de masas para la
obtención y cuantificación de bioimágenes de platino y
determinación de proteínas ligadas a fármacos platinados en
estudios de nefrotoxicidad**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR

Irene Moraleja San José

Directoras

M^a Milagros Gómez Gómez

M^a Luz Mena Fernández

Madrid, 2018

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE CIENCIAS QUÍMICAS

Departamento de Química Analítica



TESIS DOCTORAL

**Nuevas estrategias de espectrometría de masas para la obtención y
cuantificación de bioimágenes de platino y determinación de proteínas
ligadas a fármacos platinados en estudios de nefrotoxicidad**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTOR

PRESENTADA POR:

Irene Moraleja San José

Directoras:

M^a Milagros Gómez Gómez

M^a Luz Mena Fernández

Madrid, 2017



Universidad Complutense de Madrid
Facultad de Ciencias Químicas

Dpto. Química Analítica

Ciudad Universitaria
28040 Madrid
Tfno.: 91.394.43.31
Fax.: 91.394.43.29
E-mail: depquian@quim.ucm.es

Dra. M^a Milagros Gómez Gómez, Catedrática del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid,

Dra. M^a Luz Mena Fernández, Profesora Titular del Departamento de Química Analítica de la Facultad de Ciencias Químicas de la Universidad Complutense de Madrid,

HACEN CONSTAR

Que el presente trabajo titulado “Nuevas estrategias de espectrometría de masas para la obtención y cuantificación de bioimágenes de platino y determinación de proteínas ligadas a fármacos platinados en estudios de nefrotoxicidad” ha sido realizado en este Departamento y bajo nuestra dirección por la Lda. Irene Moraleja San José, constituyendo la Tesis Doctoral de la autora.

Y para que conste, firmamos la presente en Madrid a 13 de marzo de 2017.

Fdo: Dra. M^a Milagros Gómez Gómez

Fdo: Dra. M^a Luz Mena Fernández

A mi madre y mi hermana

A Manu

A la memoria de mi padre y mi abuela

“Soy de las que piensan que la ciencia tiene una gran belleza. Un científico en su laboratorio no es sólo un técnico: es también un niño colocado ante fenómenos naturales que le impresionan como un cuento de hadas”

Marie Curie

Índice y Glosario de Términos



Índice

ÍNDICE

RESUMEN	3
ABSTRACT	7
INTRODUCCIÓN	13
Capítulo 1. Los complejos de Pt como fármacos antitumorales	13
1.1. Cisplatino	15
1.2. Fármacos de Pt de segunda y tercera generación	17
1.2.1. Carboplatino	19
1.2.2. Oxaliplatino	19
1.2.3. Nedaplatino	20
1.2.4. Lobaplatino	21
1.2.5. Heptaplatino	21
1.2.6. Fármacos con base de Pt en desarrollo preclínico y bajo evaluación clínica:	22
1.3. Administración y farmacocinética de los fármacos con base de Pt	25
1.3.1. Nuevas estrategias para la administración de fármacos platinados	30
1.4. Mecanismos de acción	34
1.4.1. Internalización y extrusión celular	34
1.4.2. Interacción con su diana farmacológica: el ADN	39
1.4.3. Respuesta celular	42
1.4.4. Interacción con otras biomoléculas	44
1.5. Resistencia al tratamiento con fármacos antitumorales de Pt	49
1.6. Toxicidad debida al tratamiento con cisplatino: Nefrotoxicidad	52
1.6.1. Estrategias nefroprotectoras	55
Capítulo 2. Metodologías analíticas en metalómica	57
2.1. Preparación de la muestra para estudios metalómicos	59

2.1.1. Estrategias para la digestión de proteínas	62
2.2. Aproximaciones proteómicas para la caracterización de metaloproteínas.....	67
2.3. Técnicas de separación	68
2.3.1. Técnicas de separación electroforéticas	69
2.3.2. Técnicas de separación cromatográficas	75
2.4. Espectrometría de masas elemental.....	78
2.4.1. Análisis de bioimagen elemental en muestras biológicas mediante LA-ICP-MS	82
2.5. Técnicas de espectrometría de masas molecular para la identificación de complejos metal-proteína	91
2.5.1. Espectrometría de masas MALDI-MS.....	91
2.5.2. Espectrometría de masas ESI-MS.....	93
2.5.3. Espectrometría de masas en tándem (MS/MS)	97
2.5.4. Identificación de especies ligadas a Pt. El perfil isotópico	101
2.6. Acoplamiento de técnicas para la determinación de proteínas ligadas a fármacos de Pt.....	102
OBJETIVOS	109
PARTE EXPERIMENTAL	113
Capítulo 1. Desarrollo de estrategias bioanalíticas basadas en técnicas de separación multidimensionales y espectrometría de masas atómica y molecular para la determinación de proteínas ligadas a fármacos con base de Pt en muestras renales	115
1.1. Desarrollo de metodologías de separación multidimensionales para el fraccionamiento de proteínas y péptidos ligadas a Pt en muestras complejas.....	117
Trabajo 1: <i>“OFFGEL isoelectric focusing and polyacrylamide gel electrophoresis separation of platinum-binding proteins”</i>	123
Trabajo 2: <i>“Combining TBP-based rOFFGEL-IEF with FASP and nLC-ESI-LTQ-MS/MS for the analysis of cisplatin-binding proteins in rat kidney”</i>	135
Trabajo 3: <i>“Thiol-free reducing agents in electrophoretic separations and FASP proteolytic digestions for the analysis of metal-binding proteins”</i>	157

Trabajo 4: <i>“A shotgun approach for the identification of platinum-protein complexes”</i>	165
1.2. Obtención de iones marcadores específicos de metales mediante MS molecular para la localización e identificación de proteínas ligadas a Pt en muestras biológicas	185
Trabajo 5: <i>“Bridging the gap between molecular and elemental mass spectrometry: Higher Energy Collisional Dissoaciation (HCD) revealing elemental information”</i>	191
Capítulo 2. Desarrollo de metodologías para la obtención mediante LA-ICP-MS de bioimágenes cualitativas y cuantitativas de tejidos impactados con fármacos de Pt	211
Trabajo 6: <i>“Printing metal-spiked inks for LA-ICP-MS bioimaging internal standardization: comparison of the different nephrotoxic behavior of cisplatin, carboplatino and oxaliplatin”</i>	217
Trabajo 7: <i>“Isotope dilution analysis for the absolute quantification of metal contents in tissues by LA-ICP-IDMS”</i>	235
DISCUSIÓN INTEGRADORA	255
1. Desarrollo de estrategias bioanalíticas basadas en técnicas de separación multidimensionales y espectrometría de masas atómica y molecular para la determinación de proteínas ligadas a fármacos con base de Pt en muestras renales	256
1.1. Desarrollo de metodologías de separación multidimensional para el fraccionamiento de proteínas ligadas a Pt en muestras complejas	256
1.2. Desarrollo de un método para la digestión enzimática de proteínas ligadas a Pt.....	259
1.3. Desarrollo de una metodología “shotgun” para la identificación de complejos Pt-proteína	263
1.4. Desarrollo de una nueva metodología para la obtención de iones marcadores específicos de metales para la identificación de proteínas ligadas a Pt	267
2. Desarrollo de metodologías analíticas para la obtención de bioimágenes cualitativas y cuantitativas de riñones impactados con fármacos de Pt.....	270
CONCLUSIONES	279
BIBLIOGRAFÍA	285

GLOSARIO DE TÉRMINOS

2-DE: Electroforesis bidimensional

A: Adenina

AC: Cromatografía de afinidad

AcN: Acetonitrilo

ADN: Ácido desoxirribonucleico

ADP: Adenosín difosfato

Ala: Alanina

Arg: Arginina

ARN: Ácido ribonucleico

Asn: Asparagina

Asp: Ácido aspártico

ATC: Sistema de Clasificación Anatómica, Terapéutica y Química

ATP: Adenosín trifosfato

ATP7A/ATP7B: ATPasa transportadora de cobre α/β

BME: β -mercaptoetanol

BSA: Albúmina de suero bovino

BUN: Nitrógeno ureico en sangre

C: Citosina

CA: Anhidrasa carbónica

CaM: Calmodulina

CB[n]: Cucurbit[n]urilos

CBDCA: Ligando bidentado ciclobutanodicarboxilato

CHAPS: 3-[(3-colamidopropil)dimetilamonio]-1-propanosulfonato

CHCA: Ácido α -ciano-4-hidroxicinámico

CID: Disociación inducida por colisión

CPK: Modelo molecular tridimensional de bolas de llenado espacial

CPS: Cuentas por segundo

CTR (1/2): Proteínas transportadoras de cobre (isoformas 1/2)

Cys: Cisteína

Cyt C: Citocromo C

DACH: Ligando 1,2-diaminociclohexano

DHB: Ácido 2,5-dihidroxibenzoico

DMSO: Dimetilsulfóxido

DTE: Ditioeritritol

DTT: Ditiotreititol

ECD: Disociación por captura electrónica

EMA: Agencia europea del medicamento (*"European Medicines Agency"*)

EPR: Efecto de permeabilidad y retención aumentada

ESI: Ionización por electronebulización o electrospray

ETD: Disociación por transferencia de electrones

FASP: *"Fast assisted simple preparation"*

FDA: Agencia de alimentos y medicamentos (EEUU) (*"Food and Drug Administration"*)

FTICR: Analizador de resonancia ciclotrónica de iones con transformada de Fourier

G: Guanina

GFR: Tasa de filtración glomerular

Gln: Glutamina

Glu: Ácido glutámico

Gly: Glicina

GSH: Glutatión

Hb: Hemoglobina

HCD: Disociación por colisión a alta energía

HE: Hematoxilina-eosina

HILIC: Cromatografía de interacción hidrofílica

His: Histidina

HPLC: Cromatografía de líquidos de alta eficacia

HSA: Albúmina de suero humano

HUGO: *"Human Genome Organisation"*

IAA: Yodoacetamida

ICAT: *"Isotope-coded affinity tag"*

ICP: Plasma de acoplamiento inductivo

ICP-AES: Espectroscopia de emisión atómica con fuente de plasma de acoplamiento inductivo

ICP-MS: Espectrometría de masas con plasma de acoplamiento inductivo

ICR: Resonancia ciclotrónica de iones

ID: Dilución isotópica

IDMS: Espectrometría de masas con análisis por dilución isotópica

IEC: Cromatografía de intercambio iónico

IEF: Isoelectroenfoque

Ile: Isoleucina

IPG: Gradiente inmovilizado de pH

iTRAQ: *"Isobaric tags for relative and absolute quantitation"*

LA: Ablación láser

LC: Cromatografía de líquidos

LD: Límite de detección

Leu: Leucina

LSB: Tampón de muestra de Laemmli

LQ: Trampa de iones lineal de tipo cuadrupolo

Lys: Lisina

MALDI: Ionización-desorción por láser asistida por una matriz

MATE: Transportadores de extrusión de multifármacos y compuestos tóxicos

Met: Metionina

MMR: Reparación de apareamientos erróneos

MMS: *"Matrix matched standards"*

MS: Espectrometría de masas

MS/MS: Espectrometría de masas en tándem

MTs: Metalotioneínas

MYO: Mioglobina

NER: Reparación por escisión de nucleótidos

nrSDS-PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida con dodecilsulfato sódico en condiciones desnaturizantes no reductoras

OCT (1/2/3): Transportador de cationes orgánicos (isoformas 1/2/3)

PAGE: Electroforesis en geles de poliacrilamida

PAMAM: Poliamidoamina

PFF: Identificación de proteínas por análisis de los fragmentos peptídicos

Phe: Fenilalanina

PI: Patrón interno

PMF: Identificación de proteínas por análisis de la huella peptídica

Pro: Prolina

Q: Analizador de cuadrupolo

QIT o IT: Trampa de iones cuadrupolar o tridimensional

RMN: Resonancia magnética nuclear

RPLC: Cromatografía de fase inversa

RPTECs: Célula epiteliales de túbulo proximal renal

RSD: Desviación estándar relativa

RT: Temperatura ambiente

SDS: Dodecil sulfato sódico

SEC: Cromatografía de exclusión por tamaños

Ser: Serina

SF: Analizador de doble sector

SIMS: Espectrometría de masas de ión secundario

SOD: Superóxido dismutasa

SRMs: Materiales de referencia estándar

SXRF: Fluorescencia de rayos X con radiación de sincrotrón

T: Timina

TBP: Tributilfosfina

TCA: Ácido tricloroacético

TCEP: Tricarboxietilfosfina

TF: Transferrina

Thr: Treonina

TI: Ionización térmica

TOF: Analizador de tiempo de vuelo

Tris: 2-amino-2-hidroximetil-propano-1,3-diol

Trp: Triptófano

Trx: Tiorredoxina

Tyr: Tirosina

Val: Valina

XRF: Fluorescencia de rayos X

Resumen/Abstract

decreased.
up, reviewed.
summary, n. —
abstract, recap
ment, capitula

RESUMEN

Desde que en los años 70 se descubriese fortuitamente la actividad antineoplásica del cisplatino, éste ha sido empleado con gran éxito en el tratamiento de numerosos tumores, siendo hoy en día el fármaco más empleado en quimioterapia. Sin embargo, en su aplicación surgen diversos inconvenientes como la aparición de resistencias intrínsecas o desarrolladas al fármaco, así como la aparición de diferentes efectos secundarios. Entre estos últimos destaca la nefrotoxicidad inducida en el tratamiento con cisplatino, la cual limita la dosis administrable del fármaco. Por ello, otros fármacos con base de Pt de segunda y tercera generación han sido desarrollados con el fin de mejorar sus propiedades. Sin embargo, actualmente el cisplatino sigue siendo ineludible en las terapias contra el cáncer.

Es bien sabido que la actividad antineoplásica del cisplatino se debe a su interacción con su diana farmacológica principal, el ADN, al cual se coordina formando diferentes aductos cisplatino-ADN que provocan una disrupción en la doble hélice y provocando así la muerte celular por apoptosis. Sin embargo, debido a la gran reactividad que presenta el cisplatino, éste puede unirse a otras biomoléculas diferentes a su diana farmacológica como son las proteínas. Esta interacción es de gran

importancia, ya que juega un papel fundamental en su complicado mecanismo de toxicidad y en la aparición de resistencia al fármaco y efectos secundarios. Por ello, el estudio de dichas interacciones presenta gran interés, ya que puede arrojar cierta luz a la comprensión de los mecanismos de aparición de nefrotoxicidad, lo cual ayudaría en el diseño de terapias mejoradas y fármacos nefroprotectores.

Por todo ello, el objetivo principal de esta tesis doctoral ha consistido en el desarrollo de estrategias bioanalíticas basadas en espectrometría de masas atómica y molecular, técnicas de separación electroforéticas y nuevos métodos de preparación de la muestra para la determinación de proteínas ligadas a fármacos con base de Pt en muestras biológicas relacionadas con el fracaso renal, así como para la obtención de mapas de distribución de Pt en tejidos afectados.

En primer lugar, se han evaluado las condiciones óptimas de separación en separaciones electroforéticas mediante PAGE y OFFGEL-IEF que permitieran preservar el enlace Pt-proteína a lo largo de todo el proceso de separación, observándose que los reactivos con grupos tiólicos como la tiourea y el DTT afectaban muy negativamente a la estabilidad del enlace. Además, empleando diversos modelos proteicos incubados con los fármacos de Pt se desarrolló la metodología analítica necesaria para abordar la digestión enzimática de los complejos de Pt mediante el método FASP. Este método resultó apropiado para realizar las digestiones enzimáticas de las muestras biológicas con complejos Pt-proteína, ya que permitió mantener la integridad de los enlaces en un alto porcentaje. Además, se abordó una aproximación “*shotgun*” en la que los complejos Pt-proteína fueron inicialmente digeridos mediante la metodología FASP optimizada, seguido de su separación a nivel de péptidos mediante OFFGEL-IEF, lo cual permitió mejorar la identificación de la unión del cisplatino a las proteínas.

Por otro lado, para facilitar la identificación de los puntos de unión entre los fármacos antitumorales con base de Pt y las proteínas, se ha desarrollado una estrategia para la obtención de información elemental y molecular de forma simultánea en un mismo análisis por espectrometría de masas, para lo cual se empleó la celda de alta energía de colisión de la que disponen los equipos Orbitrap. Esto

permitió una sencilla localización de péptidos ligados a Pt dentro de la complejidad de las carreras cromatográficas y los miles de espectros de masas obtenidos habitualmente mediante esta técnica, lo cual es de gran interés de cara a la identificación de proteínas ligadas a Pt en muestras biológicas.

Finalmente, y debido a la diferente nefrotoxicidad observada en los tratamientos con cisplatino, carboplatino y oxaliplatino, se decidió afrontar el estudio de la distribución de estos tres fármacos en muestras de riñones de ratas tratadas con los mismos, mediante la técnica de LA-ICP-MS. El conocimiento de la diferente distribución de los mismos en el riñón puede dar información acerca de su diferente carácter nefrotóxico. Para ello, fue necesario el desarrollo de una estrategia de estandarización interna de la señal obtenida que permitiera obtener bioimágenes comparables entre diferentes tejidos y diferentes sesiones de medida. El método desarrollado consistió en la impresión, con una impresora convencional de chorro de tinta, de disoluciones que contenían el patrón interno de interés sobre la superficie de las láminas de tejido. Con este procedimiento fue posible obtener bioimágenes normalizadas, lo que permitió comparar las diferentes distribuciones de los tres fármacos en el riñón. En este punto, se observó que mientras cisplatino y carboplatino se distribuían principalmente por la zona cortical del riñón, el oxaliplatino se distribuía de forma más o menos homogénea a lo largo de toda la lámina, lo cual podría estar relacionado con su comportamiento no nefrotóxico. Por otro lado, siguiendo el mismo procedimiento de impresión, se afrontó el desarrollo una estrategia de cuantificación de bioimágenes mediante la adición de un patrón enriquecido isotópicamente y la posterior cuantificación de las imágenes por dilución isotópica. Mediante el empleo de esta estrategia se ha conseguido cuantificar las diferencias en la cantidad de fármaco presente en las zonas cortical y medular para los tres fármacos de Pt mencionados anteriormente, mostrando que tanto cisplatino como carboplatino (a diferencia del oxaliplatino) presentan una concentración de Pt en la corteza muy superior a la encontrada en la médula.

ABSTRACT

Since the anticancer activity of cisplatin was discovered by chance in the 1970s, it has been successfully used in the treatment of numerous tumors, and is nowadays the most widely used drug in chemotherapy. However, several problems arise in its application, such as the appearance of intrinsic or developed resistance to the drug, as well as the appearance of different side effects. Among the latter, nephrotoxicity induced in cisplatin treatment, which limits the administrable dose of the drug, is highlighted. Therefore, other drugs with second and third generation Pt base have been developed in order to improve their properties. However, cisplatin is currently unavoidable in anticancer therapies.

It is well known that the antineoplastic activity of cisplatin is due to its interaction with its main pharmacological target, DNA, which is coordinated by forming different cisplatin-DNA adducts that cause disruption in the double helix and thus causing cell death by apoptosis. However, due to the high reactivity of cisplatin, it can bind to other biomolecules different than its pharmacological target such as proteins. This interaction is of great importance as it plays a key role in its complicated mechanism of toxicity and in the appearance of drug resistance and side effects.

Therefore, the study of these interactions is of great interest, as it may shed some light on the understanding of the mechanisms of nephrotoxicity, which would help in the design of improved therapies and nephroprotective drugs.

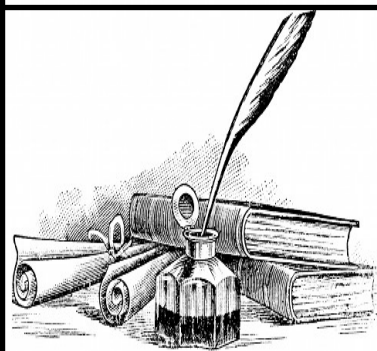
Therefore, the main objective of this doctoral thesis has consisted in the development of bioanalytical strategies based on atomic and molecular mass spectrometry, electrophoretic separation techniques and new methodologies for sample preparation for the determination of proteins bound to Pt-based drugs in biological samples related to renal failure, as well as obtaining Pt distribution in affected tissues.

Firstly, the optimal separation conditions in electrophoretic separations have been evaluated by PAGE and OFFGEL-IEF to allow preservation of the Pt-protein bond throughout the separation process, with thiol groups such as thiourea and DTT had a very negative effect on link stability. In addition, using several protein models incubated with Pt drugs, the analytical methodology was developed to address the enzymatic digestion of Pt complexes using the FASP method. This method was appropriate to perform the enzymatic digestions of the biological samples with Pt-protein complexes, since it allowed maintaining the integrity of the bonds in a high percentage. In addition, a "shotgun" approach was addressed in which the Pt-protein complexes were initially digested by the optimized FASP methodology, followed by their separation at the peptide level by OFFGEL-IEF, which improved the identification of cisplatin binding to proteins.

On the other hand, to facilitate the identification of the binding sites between the antitumor drugs based on Pt and proteins, a strategy has been developed to obtain elemental and molecular information simultaneously in the same analysis by mass spectrometry, where the high-energy collision cell used by Orbitrap equipment was used. This allowed a simple location of Pt-bound peptides within the complexity of the chromatographic runs and the thousands of mass spectra usually obtained by this technique, which is of great interest for the identification of Pt-bound proteins in biological samples.

Finally, due to the different nephrotoxicity observed in the treatments with cisplatin, carboplatin and oxaliplatin, it was decided to study the distribution of these three drugs in kidney samples from rats treated with them, using the LA-ICP- MS. The knowledge of the different distribution of the same in the kidney can give information about its different nephrotoxic character. For this, it was necessary to develop a strategy of internal standardization of the obtained signal that allowed obtaining comparable bio-images between different tissues and different measurement sessions. The method developed consisted of the printing, with a conventional printer, of solutions containing the internal pattern of interest on the surface of the tissue sheets. With this procedure it was possible to obtain normalized bioimaging, which allowed comparing the different distributions of the three drugs in the kidney. At this point, it was observed that while cisplatin and carboplatin were mainly distributed in the cortical area of the kidney, oxaliplatin was distributed more or less homogeneously throughout the lamina, which could be related to its non-nephrotoxic behavior. On the other hand, following the same printing procedure, a bioimaging quantification strategy was addressed by the addition of an isotopically enriched pattern and the subsequent quantification of the images by isotopic dilution. By using this strategy, it has been possible to quantify the differences in the amount of drug present in the cortical and medullary areas for the three Pt drugs mentioned above, showing that both cisplatin and carboplatin (unlike oxaliplatin) have a concentration of Pt in the cortex much superior to the one found in the marrow.

Introducción



INTRODUCCIÓN

Capítulo 1. Los complejos de Pt como fármacos antitumorales

La **quimioterapia** es definida por la RAE (Real Academia Española) como el *“Tratamiento de las enfermedades por medio de productos químicos”*. Sin embargo, lo más habitual es que el término quimioterapia se emplee para referirse al tratamiento con fármacos específicos para combatir enfermedades neoplásicas o cancerígenas. La quimioterapia como tal surgió en la antigua Grecia, pero no fue hasta la década de 1940 cuando se comenzó a emplear para el tratamiento contra el cáncer. La idea de que el cáncer podía ser tratado con agentes farmacológicos surgió tras observarse una disminución de los leucocitos en personas expuestas al gas mostaza durante la Segunda Guerra Mundial. Aquel descubrimiento dio lugar al tratamiento con este agente químico de pacientes con linfomas, observándose una disminución de la masa tumoral. A partir de entonces, han sido muchos los agentes químicos utilizados como antineoplásicos. De hecho, en los últimos 30 años, 700 sustancias aprobadas por la FDA (*Food and Drug Administration*) se han incorporado en ensayos clínicos como candidatos en el tratamiento contra el cáncer.

El Sistema de Clasificación Anatómica, Terapéutica y Química (ATC) de la Organización Mundial de la Salud (OMS), clasifica a los fármacos antitumorales principalmente en seis grupos dependiendo de su naturaleza química y mecanismos de acción (**Figura 1**). Estos fármacos pertenecen al subgrupo L01 denominado

“Antineoplastic Agents”. Todos ellos pueden ser administrados solos o en combinación con otros con el fin de conseguir un efecto sinérgico, lo cual dependerá del tratamiento del tipo de tumor, del estado del paciente, de los tratamientos administrados previamente, etc.

El descubrimiento fortuito de las propiedades antineoplásicas del cisplatino y su empleo clínico en la década de 1970, representó un hito importante en la historia de los medicamentos para tratar el cáncer. El año 2015 ha marcado el 50 aniversario del descubrimiento de este fármaco, y como resultado de su gran éxito, los fármacos antitumorales con base de Pt son los más utilizados en los tratamientos contra el cáncer. Esta tesis doctoral está centrada en los fármacos con base de Pt aprobados mundialmente para el tratamiento contra el cáncer en humanos: cisplatino, carboplatino y oxaliplatino, cuyas principales características, mecanismos de actuación y metodologías para la determinación de los mismos se expondrán a continuación.

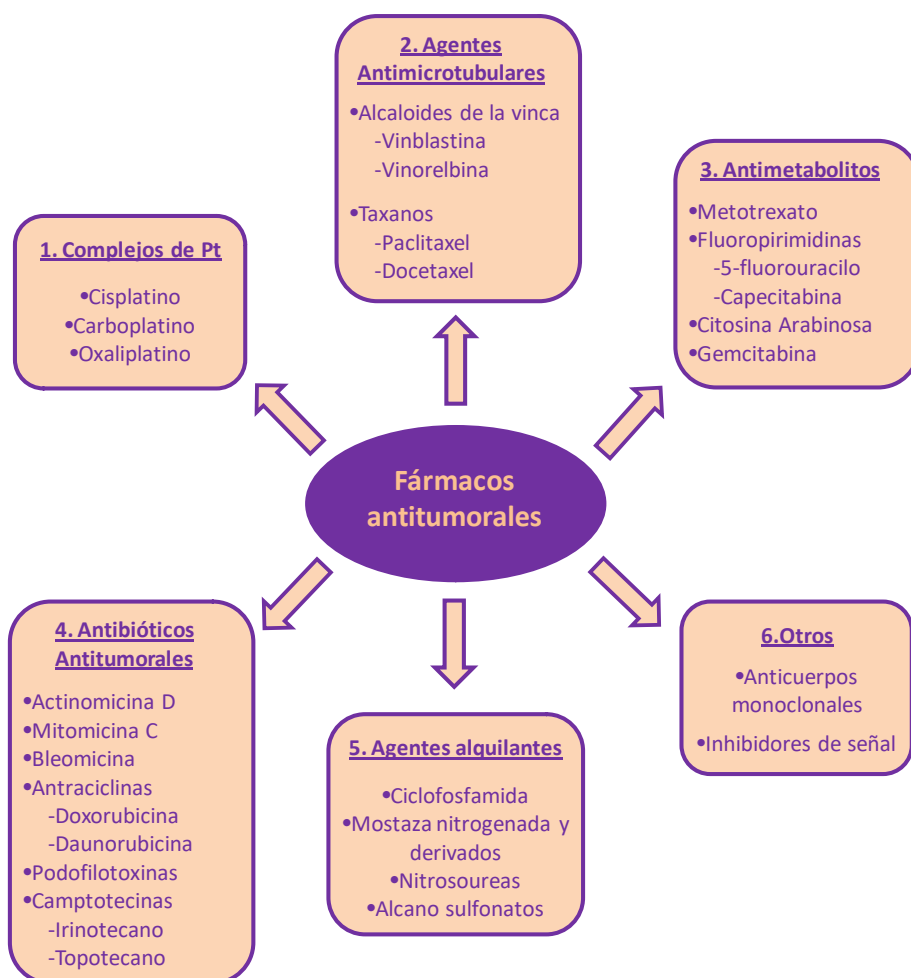


Figura 1. Clasificación de fármacos antitumorales establecida por la OMS

1.1 Cisplatino

El cisplatino fue sintetizado por primera vez en 1844 por el químico italiano M. Peyrone, conociéndose entonces este compuesto sólido de color amarillo brillante como cloruro de Peyrone [1]. Su estructura molecular fue dilucidada por Alfred Werner en 1893 [2], la cual consiste en un compuesto de coordinación plano cuadrado de Pt(II) que contiene dos ligandos cloruro y dos ligando amino en posición *cis*, tal y como se muestra en la **Figura 2**.

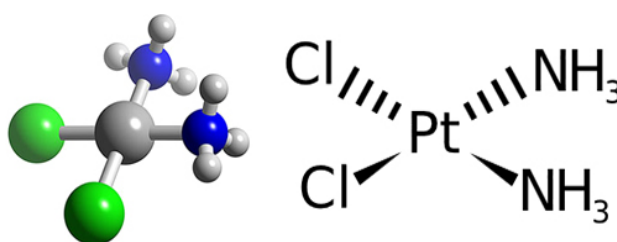


Figura 2. Estructura del cisplatino

Sin embargo, no fue hasta casi un siglo después cuando en 1965 B. Rosenberg *et al.* descubrieron por casualidad sus propiedades citotóxicas [3]. Durante un estudio de la influencia de los campos eléctricos sobre el desarrollo celular de una población de bacterias *Escherichia coli* en el que se empleaban electrodos de platino, observaron el cese en la división de dichas bacterias, lo que indicaba una pérdida de la capacidad de replicación de su ADN. No obstante, observaron el crecimiento de dichas bacterias en forma de largos filamentos, lo cual indicaba que la síntesis del ARN y proteínas permanecía intacta. Este sorprendente suceso hizo que Rosenberg llevase a cabo estudios más detallados, en los que llegó a la conclusión de que la aparición de complejos de platino procedentes de productos de hidrólisis del medio de cultivo eran los responsables de la inhibición de la división de las bacterias. Posteriormente, se realizaron estudios sobre los efectos de diversos complejos de platino sobre tumores implantados artificialmente en ratas. Los resultados de dichos estudios, publicados en 1969 [4], demostraron la gran efectividad del cisplatino sobre células de sarcoma y leucemia comparada con otros complejos platinados. De hecho, se observó que el isómero *trans*- presentaba una actividad antitumoral muy escasa. Dados los prometedores resultados obtenidos con el cisplatino, en 1972 se iniciaron los primeros ensayos clínicos, en 1978 fue aprobado para su uso clínico por la FDA en Estados

Unidos [5], y más tarde en Japón y Europa, siendo comercializado por Bristol-Myers Squibb bajo el nombre de Platinol®.

Desde entonces y hasta ahora, el cisplatino es uno de los fármacos antitumorales más empleados, utilizándose en el tratamiento de tumores sólidos de cabeza y cuello, testículos, ovarios, vejiga, esófago, pulmones, mama, estómago y próstata, además de ser empleado para el tratamiento de neuroblastomas, sarcomas, mieloma múltiple, melanoma, mesotelioma y linfomas [6–10]. Se ha calculado que el cisplatino se emplea en 32 de los 78 tratamientos quimioterapéuticos enumerados en la lista de Martindale [7], y puede ser administrado sólo o en combinación con otros agentes citostáticos como inhibidores de la topoisomerasa II (doxorubicina, etopósido, mitomicina, bleomicina y epirrubicina); mostazas (ciclofosfamida, melfalán e ifosfamida); antimetabolitos (ciclogemcitabina, 5-fluorouracilo y metotrexano); alcaloides vinca (vinblastina y vinorelbina) o taxoles (paclitaxel)[6].

Los fármacos antitumorales intervienen en la inhibición de la replicación y transcripción del ADN. Por ello, independientemente de cuál sea su mecanismo de acción, que será explicado más adelante en el apartado 1.4, actúan no sólo sobre las células cancerosas sino también en células no tumorales, actuando especialmente en aquellas que poseen mayor tasa de replicación como son las células epiteliales, las células de la médula ósea y las germinales. Este hecho se traduce en la aparición de efectos secundarios a corto y largo plazo en tejidos sanos del organismo, siendo los principales en el caso del cisplatino la nefrotoxicidad (reducción y fallo de la actividad renal), ototoxicidad (pérdida auditiva), neurotoxicidad (daño en el sistema nervioso) y mielosupresión (reducción en la actividad de la médula ósea) [11]. Entre ellos, la nefrotoxicidad es el efecto adverso más estudiado, y dado que es dosis-dependiente, limitará la dosis máxima de fármaco que puede ser administrada [12].

Debido a estos efectos secundarios y como alternativa al cisplatino, se han desarrollados otros compuestos de coordinación sustituyendo el metal central por elementos como Ru, Ga, Ti y Au [13–17]. El cambio en el metal central supone el cambio de los mecanismos de acción del fármaco, permitiendo nuevas estrategias de tratamiento para tumores que presentan una resistencia intrínseca o adquirida al tratamiento con cisplatino. Sin embargo, muchos de los compuestos no-platinados desarrollados no han sido aprobados para su uso en humanos al no superar los

ensayos clínicos. Los hallazgos más importantes se han encontrado para los compuestos de Ru (III) KP1019/NKP-1339 y NAMI-A, y para los compuestos de Ga (III) Tris(maltolato) de galio (III) [18]. Cabe destacar también el descubrimiento de la actividad antitumoral del compuesto de trióxido de arsénico (As_2O_3) conocido como Trisenox (o ATO), el cual ha sido aprobado recientemente para el tratamiento de leucemia promielocítica aguda [19]. Además de los complejos no platinados, surgió una nueva línea de investigación basada en el desarrollo de nuevos fármacos de platino que pudieran mejorar las propiedades del cisplatino y a la vez redujeran sus efectos secundarios. Así, surgieron los fármacos de Pt de segunda y tercera generación, los cuales se pasarán a detallar a continuación.

1.2 Fármacos de Pt de segunda y tercera generación

Como se ha comentado anteriormente, debido a los problemas asociados al tratamiento con cisplatino, surgió una línea de investigación enfocada al desarrollo de fármacos con base de Pt de nueva generación. La finalidad de dicha investigación consistiría en desarrollar nuevos compuestos que presentasen menores efectos secundarios o más tolerables, y que presentasen una menor resistencia al tratamiento.

Inicialmente, la síntesis de los nuevos complejos de platino se abordó siguiendo las denominadas “**reglas estructura-actividad**” propuestas por Cleare y Hoeschele en 1973 [20], las cuales proponían lo siguiente:

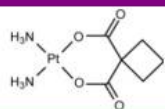
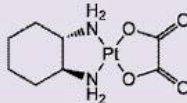
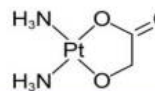
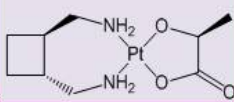
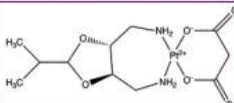
- Los complejos sintetizados pueden ser complejos de Pt(II) y Pt(IV) siempre que contengan dos ligandos amino en posición *cis*- con un enlace N-H. Dichos ligandos permanecerán unidos al Pt en la unión de éste al ADN, por lo que serán ligandos fijos.
- Los demás ligandos deben ser aniones haluro u otro tipo de aniones que se unan al metal con enlaces de fuerza media, por lo que dichos ligandos se denominarán salientes. En principio, se postuló que la fuerza de dichos enlaces será inversamente proporcional a la actividad y toxicidad del fármaco.
- Los complejos de Pt(IV) podrían emplearse a pesar de ser menos activos que los de Pt(II), ya que la mayor solubilidad de estos complejos en agua

permitiría su administración por vía oral, y podrían activarse posteriormente en el organismo tras reducirse a Pt(II) por acción de algún agente reductor como la cisteína.

- Los complejos sintetizados deberán ser neutros, para que crucen más eficazmente la membrana celular.

Siguiendo estos requisitos, se han llegado a sintetizar más de 3000 compuestos con base de platino como posibles fármacos antineoplásicos. Sin embargo, la mayoría no han tenido éxito [6,21]. Tras treinta años desde la aprobación del empleo del cisplatino en humanos, otros veintitrés fármacos han entrado en el proceso de ensayos clínicos para su aprobación. Sin embargo, sólo dos de ellos (carboplatino y oxaliplatino) han sido mundialmente aprobados para su uso en humanos, y otros tres (nedaplatino, lobaplatino y heptaplatino) han sido aprobados para su comercialización en países concretos (Japón, China y Corea respectivamente). En la **Tabla 1** se recogen las características más importantes de estos compuestos, de los cuales se hablará a continuación.

Tabla 1. Fármacos con base de Pt de 2ª y 3ª generación aprobados para su uso en humanos

Fármaco	Estructura	Nombre comercial	Compañía Farmacéutica	Aplicación	Efecto tóxico limitante
Carboplatino		Paraplatin®	Genérico	Mundial	Mielosupresión
Oxaliplatino		Eloxatin®	Sanofi-Aventis	Mundial	Neurotoxicidad
Nedaplatino		Aqupla®	Shionogi Pharmaceuticals	Japón	Mielosupresión
Lobaplatino		Lobaplatin	Asta-Medica	China	Trombocitopenia
Heptaplatino		Sunpla	SK Chemicals Life Sciences	Corea	Nefrotoxicidad / Sangrado intra-abdominal

1.2.1 Carboplatino

El **carboplatino** (*cis*-diamino-[1,1-ciclobutanodicarboxilato] platino (II)) es un fármaco de segunda generación diseñado específicamente para reducir los efectos secundarios asociados al tratamiento con cisplatino. Como puede observarse en su estructura (**Tabla 1**), la molécula fue sintetizada sustituyendo los grupos cloruro del cisplatino por el ligando bidentado ciclobutanodicarboxilato (CBDCA). Aprobado por la FDA en 1989 y comercializado inicialmente bajo el nombre de *Paraplatin*TM, el carboplatino está siendo utilizado principalmente como sustituto del cisplatino en el tratamiento de cáncer de ovarios (donde se emplea en combinación con Paclitaxel) [22], para el tratamiento de cáncer de pulmón microcítico y no microcítico [23,24], y en los tumores de cabeza, cuello, mama, testículos, vejiga y cerebro [25]. Como más adelante se explicará en el apartado dedicado a la farmacocinética y administración de estos fármacos (apartado 1.3), el carboplatino presenta una reactividad menor que el cisplatino. Dependiendo del tipo de cáncer, el carboplatino puede llegar a tener una efectividad de 1/8 hasta 1/45 veces la del cisplatino. Este hecho conduce a que en los tratamientos con carboplatino las dosis administradas sean de hasta cuatro veces superiores. Sin embargo, a pesar de estas altas dosis administradas, se observó un menor efecto nefrotóxico para este fármaco. También es menos tóxico para el tracto gastrointestinal y menos neurotóxico y ototóxico. El principal inconveniente del carboplatino es su efecto mielosupresor, produciendo una disminución de los glóbulos rojos, blancos y plaquetas de la médula ósea, llegando incluso a un 10% de sus niveles de producción habituales [26,27].

1.2.2 Oxaliplatino

El **oxaliplatino** (1*R*,2*R*-diaminociclohexano oxalato platino (II)) fue el primer fármaco aprobado para su uso humano capaz de superar la resistencia que presentan ciertos tumores al tratamiento con cisplatino y carboplatino [28,29]. Una hipótesis de esta diferente citotoxicidad es la formación de aductos con el ADN diferentes a los que forma el cisplatino, como será explicado más adelante en el apartado 1.4.2. Fue descubierto en 1976 en la Universidad de la Ciudad de Nagoya por el profesor Yoshinori Kidani, al que le fue concedida la patente de EE.UU. 4.169.846 en 1979. Este fármaco de tercera generación fue aprobado en el año 1999 por la EMA (*European*

Medicines Agency) y en 2002 por la FDA [30], y fue comercializado por la farmacéutica Sanofi-Aventis con el nombre de EloxatinTM. En agosto de 2009, la FDA aprobó su formulación genérica. Como puede observarse en su estructura (**Tabla 1**), posee dos ligandos bidentados: el ligando estable 1,2-diaminociclohexano (DACH) y un ligando lábil de oxalato, el cual le confiere una mayor solubilidad en agua (6 g L^{-1} a 20°C) respecto a cisplatino y carboplatino. El oxaliplatino ha sido mundialmente aprobado para su empleo en terapias adyuvantes de cáncer colorrectal metastásico en combinación con los tratamientos tradicionales de este tipo de tumor [7,30]. Sin embargo, recientes estudios intentan ampliar su espectro de actividad, evaluando su eficacia en el tratamiento de los adenocarcinomas gástrico metastásico y de esófago. El efecto tóxico dosis-dependiente más importante de este fármaco es la neurotoxicidad (aparece en el 85-95% de los pacientes), ya que produce graves neuropatías periféricas que podrían llegar a ser irreversibles si las terapias son prolongadas [31,32]. Sin embargo, presenta un perfil de toxicidad bastante inocuo, ya que presenta menor nefrotoxicidad y ototoxicidad que el cisplatino, y menor mielosupresión que el carboplatino [33].

1.2.3 Nedaplatino

El **nedaplatino** (*cis*-diaminoglicolato platino (II)), es un fármaco de segunda generación desarrollado con el fin de disminuir las toxicidades asociadas al cisplatino [34]. Fue desarrollado en 1983 por la compañía japonesa Shionogi Pharmaceuticals, comercializándolo más tarde con el nombre de AquplaTM. Desde que fuera aprobado para su uso en humanos en Japón en 1995, ha sido empleado en los tratamientos de cáncer de pulmón (de células pequeñas y grandes), en el cáncer de esófago, cabeza y cuello, cervical, de ovario y de vejiga [6,35,36]. En este punto, diversos estudios clínicos han demostrado que nedaplatino presenta una actividad antitumoral superior a carboplatino, y similar a cisplatino [36,37]. En cuanto a su estructura (**Tabla 1**), se puede observar que contiene los mismos ligandos amino que cisplatino y carboplatino, mientras que como grupo saliente contiene un ligando bidentado de glicosilato. Así, el nedaplatino forma los mismos acuocomplejos que carboplatino, y presenta una solubilidad en agua diez veces mayor a la del cisplatino. Este fármaco presenta el mismo efecto secundario limitante que el carboplatino, la mielosupresión, que limita la

dosis administrable a 90 mg m^{-2} [38]. Sin embargo, presenta una menor toxicidad gastrointestinal y menor nefrotoxicidad comparada con cisplatino y carboplatino [36,39].

1.2.4 Lobaplatino

El **lobaplatino** (*R,R/S,S*)-(1,2-ciclobutanodimetanamida)[(2*S*)-2-hidroxiopropanoato,*O,O'*] platino (II)] es una mezcla diastereomérica de los complejos de Pt (II) que contienen el 1,2-bis(aminometil)ciclobutano como ligando estable, conteniendo en este caso el ácido láctico como grupo saliente (**Tabla 1**). Este fármaco de tercera generación fue desarrollado inicialmente por ASTA Pharma AG (Frankfurt, Alemania) y comercializado posteriormente en China. En este país fue aprobado para su uso en humanos para el tratamiento de leucemia mielógena crónica y cáncer de pecho metastásico [40]. En cuanto a sus efectos secundarios, este fármaco no induce alopecia [41] ni nefro- neuro- o ototoxicidad [42]. Sin embargo, suele producir anemia, leucopenia, náuseas y vómitos, siendo su efecto principal dosis-limitante la trombocitopenia [40,43].

1.2.5 Heptaplatino

El **heptaplatino**, cis-malonato [(4*R,5R*)-4,5-bis(aminometil)-2-isopropil-1,3-dioxolano]platino (II) fue aprobado para el tratamiento de cáncer gástrico en Corea del Sur. Desarrollado por SK Chemicals Life Sciences y comercializado bajo el nombre de Sunpla, los primeros estudios clínicos sugirieron una mayor actividad antitumoral y una menor toxicidad que el cisplatino en varias líneas celulares. Además, presenta una mayor estabilidad en disolución, una baja toxicidad y una alta actividad antitumoral frente a células resistentes al tratamiento con cisplatino [44–46]. Este fármaco se emplea en el tratamiento de cáncer gástrico y en cánceres microcíticos de cabeza y cuello, siendo administrado en combinación con paclitaxel [47]. La máxima dosis que puede ser administrada son 480 mg m^{-2} , debido a que presenta como efectos secundarios limitantes la nefrotoxicidad y mielosupresión [6].

1.2.6 Fármacos con base de Pt en desarrollo preclínico y bajo evaluación clínica:

Además de los fármacos anteriormente comentados que han sido aprobados para su uso en humanos, existen en la actualidad nuevos fármacos que se encuentran en desarrollo preclínico y bajo evaluación clínica (**Figura 3**):

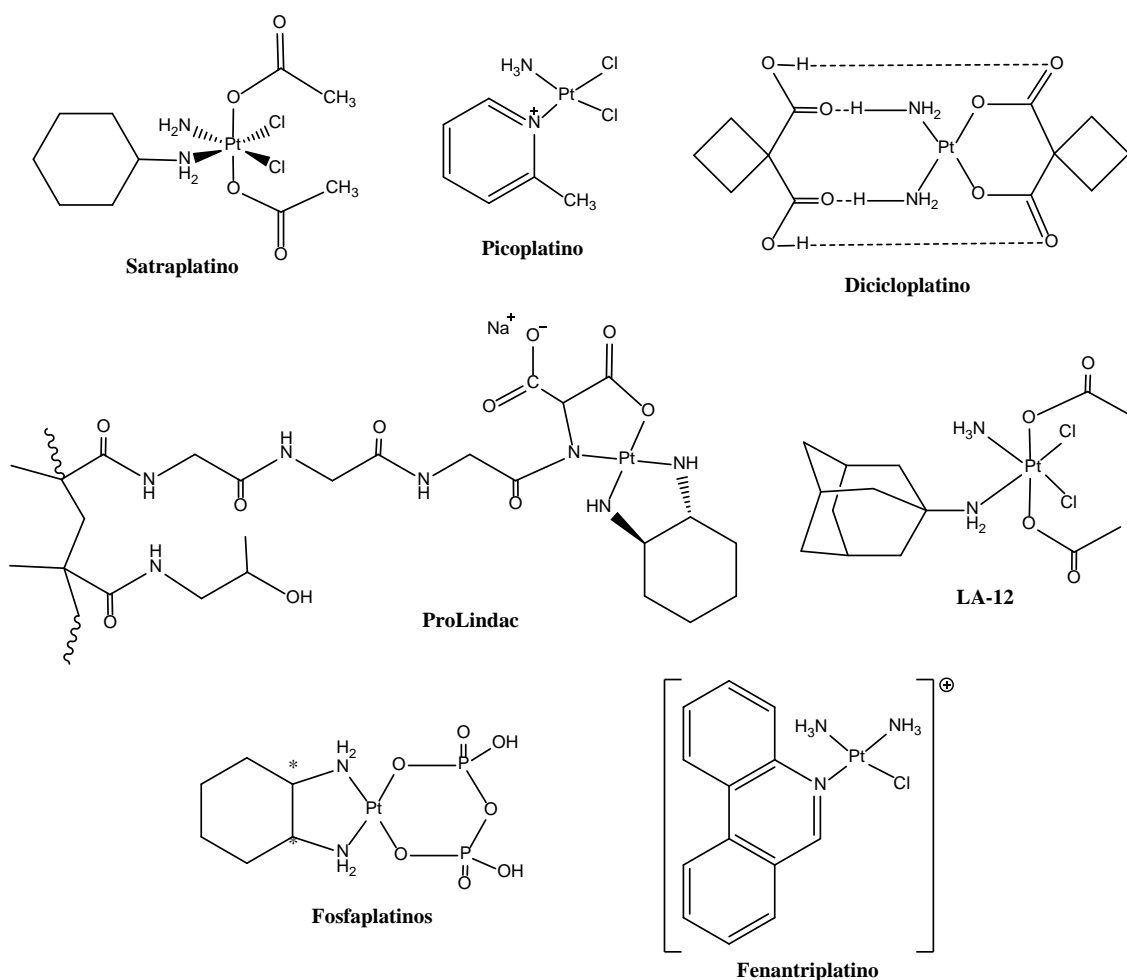


Figura 3. Estructuras de fármacos que se encuentran actualmente en desarrollo preclínico o bajo evaluación clínica

- El **satraplatino** (bis-(acetato-O)aminodiclorociclohexilaminoplatino (IV)), es un fármaco con base de Pt activo oralmente que ha mostrado actividad antitumoral frente a varias líneas celulares resistentes a cisplatino, incluyendo líneas celulares humanas de pulmón, ovario, cérvix y próstata (**Figura 3**). Este compuesto es absorbido rápidamente por la mucosa gastrointestinal, y una vez que entra en el torrente sanguíneo se reduce produciendo al menos seis complejos diferentes de Pt (II), entre los cuales el *cis*-aminodiclorociclohexilaminoplatino (II) es el más activo y abundante.

La dosis máxima tolerada es de 45-50 mg m⁻² por día, siendo los efectos tóxicos limitantes la mielosupresión y las náuseas [48–50].

- El **picoplatino** (*cis*-aminodicloro-2-metilpiridina platino (II)) fue desarrollado inicialmente para eludir la resistencia mediada por la unión al glutatión. Su estructura (**Figura 3**) con un anillo de piridina situado perpendicularmente al plano del átomo de platino, produce un impedimento estérico que evita el ataque nucleófilo de los tioles a este compuesto. Estudios *in vitro* han demostrado la capacidad de este compuesto para superar la resistencia al cisplatino, mostrando actividad antitumoral en líneas celulares resistentes a cisplatino, carboplatino y oxaliplatino. Además, en estudios *in vivo* se ha demostrado su efectividad en el tratamiento de cáncer de ovarios [51–55].

- El **Lipoplatino**TM consiste en una formulación liposomal de cisplatino encapsulado que presenta menores efectos secundarios y que atraviesa con mayor facilidad la membrana plasmática. Ha sido sometido a diversos ensayos clínicos, incluyendo dos de fase III, donde se estudió la efectividad de este fármaco en células escamosas de carcinoma de cabeza y cuello y en cáncer pulmonar de células no pequeñas (NSCLC) [56]. En cuanto a sus efectos secundarios, se ha observado una baja nefrotoxicidad y neutropenia. Además, la tasa de respuesta en pacientes tratados con cinco ciclos alcanza el 80%, por lo que se ha propuesto su empleo en radioquimioterapia adyuvante pre- o postoperatoria para el tratamiento de cáncer gástrico [57].

- El **ProLindac**TM consiste en una formulación de Pt polimérica que produce los mismos componentes activos que el oxaliplatino en el interior de las células tumorales (**Figura 3**). Está formado por el polímero hidrofílico biocompatible hidroxipropilmetacrilamida. Esta composición le permite al fármaco una mayor permeabilidad en los tumores sólidos y un mayor efecto de retención, además de ser estable al pH del torrente sanguíneo. Sin embargo, el pH más ácido de los tejidos tumorales con respecto a los tejidos sanos, hace que el compuesto se descomponga liberando el complejo activo de Pt.

- El **dicicloplatino** consiste en una reformulación del carboplatino sintetizado por las farmacéuticas Sopo-Xingda and Bioplatin AG que se encuentra actualmente bajo evaluación clínica en China. La estructura de este compuesto consiste en un ligando extra de CBDCA que se encuentra unido a la molécula original de carboplatino por

puentes de hidrógeno, tal y como puede verse en la **Figura 3**. Este nuevo ligando hace que el carboplatino sea más estable disminuyendo su velocidad de hidrólisis. La dosis máxima tolerada que ha sido observada es de 550 mg m^{-2} , aunque la dosis recomendada es 450 mg m^{-2} administrada una vez cada tres semanas, superior a la del carboplatino [58]. Los resultados publicados hasta el momento para este fármaco no muestran diferencias significativas entre los resultados obtenidos en pacientes tratados con dicicloplatinio combinado con paclitaxel y pacientes tratados con carboplatino para células de cáncer de pulmón [59].

- El **LA-12** es un profármaco de Pt (IV) que requiere la reducción intracelular a Pt (II) por parte del glutatión y el ascorbato, así como la hidrólisis de sus ligandos cloruro salientes para su posterior unión al ADN. La alta actividad que presenta este fármaco se atribuye parcialmente a los ligandos lipofílicos que presenta en su estructura (**Figura 3**). Su estructura incluye un ligando adamantilamina similar al fármaco memantina, aprobado para el tratamiento del Alzheimer, y dos grupos axiales acetato que son eliminados tras la reducción del complejo a Pt (II) [60]. Hasta la fecha no se han publicado los resultados de los ensayos clínicos en fases I y II para este fármaco.

- Los **fosfaplatinos** son una familia de fármacos con base de Pt que se encuentran bajo desarrollo preclínico por Phosplatin Therapeutics (USA). Estos fármacos están basados en la estructura del cisplatino y oxaliplatino donde los ligandos lábiles de dichos fármacos han sido reemplazados por un ligando pirofosfato (**Figura 3**). A diferencia de los fármacos de Pt tradicionales, la actividad citotóxica de estos fármacos no parece estar basada en su unión al ADN, permaneciendo los ligandos fosfato unidos al fármaco durante largos periodos de tiempo [61]. Se ha encontrado que este fármaco produce apoptosis celular específica en las fases S y G2 del ciclo celular, encontrándose una elevada actividad en estudios *in vitro* e *in vivo* en líneas celulares cancerosas humanas resistentes al tratamiento con cisplatino [62]. Además, la menor toxicidad observada para estos fármacos ha permitido la administración intravenosa del (1*R*,2*R*-diaminociclohexano) dihidrogeno-pirofosfato platino (II) en una dosis seis veces superior a la del cisplatino [63].

- El **fenantriplatino** se encuentra bajo desarrollo preclínico por Blend Therapeutics (USA). Su estructura, basada en el cisplatino, sustituye uno de los ligando cloruro de éste por fenantridina (**Figura 3**). Puesto que este fármaco sólo posee un

sustituyente lábil, sólo es capaz de formar aductos monofuncionales con el ADN. Como resultado, la distorsión que produce en el ADN se da en menor extensión con respecto al cisplatino. A pesar de esto, inhibe la transcripción del ADN mediante el bloqueo de la acción de la RNA polimerasa II. El fenantriplatino presenta una internalización celular mayor que el cisplatino, lo que lo hace unas 40 veces más citotóxico [64].

Además de los fármacos comentados, han existido numerosas formulaciones con base de Pt que han sido sometidas a ensayos clínicos para su uso en humanos, pero que finalmente no han obtenido la aprobación para su comercialización e implantación como fármacos antitumorales por diversas razones: insuficiente actividad antitumoral, alta toxicidad o incluso por cuestiones meramente económicas. Algunos de estos fármacos son el JM-11, NSC 170898, el Ormaplatino, Sebriplatino, Enloplatino, Zeniplatino, Spiroplatino, Ciclopatam, Miboplatino, Iproplatino, TRK-710, SPI-77, Aroplatino y BBR 3464 [6].

1.3 Administración y farmacocinética de los fármacos con base de Pt

El **cisplatino** es administrado principalmente como una infusión intravenosa, ya que no es efectivo por vía oral debido a su lenta distribución farmacológica mediante esta vía. Las dosis administradas suelen oscilar entre 20 y 140 mg m⁻² dependiendo del tipo de tumor, y puede administrarse: como monodosis, o repartido en ciclos de 5 dosis en 5 días, repitiéndose estos ciclos cada tres semanas, siendo esta última forma de administración la más frecuente. Además, como se ha comentado anteriormente, es habitual el empleo de terapias combinadas con otros agentes antitumorales [7], pudiéndose rebajar la dosis de cisplatino administrada en esos casos a 20-30 mg m⁻². También, pero de forma menos usual, la administración puede realizarse mediante una infusión continua de varias horas de duración [65], o por vía intraperitoneal [66]. El fármaco suele administrarse disuelto en una solución salina de 0.9% de NaCl para evitar la hidrólisis inmediata del fármaco.

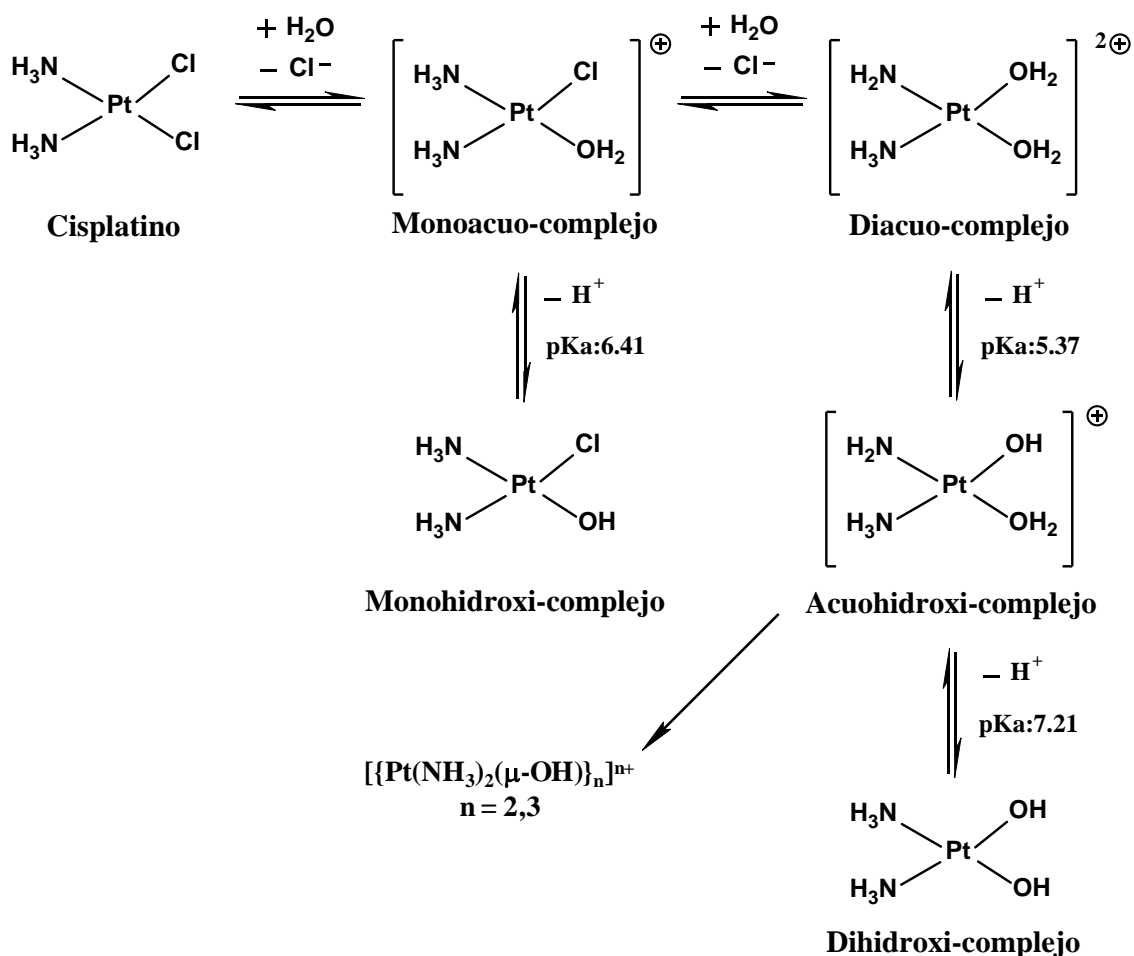


Figura 4. Hidrólisis del cisplatino en medio acuoso

Debido a la naturaleza lábil que presentan los enlaces formados entre los ligandos cloruro y el átomo de Pt, este fármaco experimenta reacciones de hidrólisis cuando se encuentra en medio acuoso (**Figura 4**). Dependiendo de las condiciones de pH existentes en el medio, da lugar a diferentes acuo(hidroxi)derivados, convirtiéndose fundamentalmente en monoacu- y diacuocomplejos [67–69]. Estas reacciones de hidrólisis juegan un papel fundamental en la activación de los fármacos antitumorales con base de Pt, ya que los acuocomplejos formados son altamente reactivos, teniendo mucha tendencia a sustituir sus moléculas de agua por ligandos nucleofílicos que contengan átomos dadores de electrones como el Se, P, As, N y S [70,71]. El Pt (II) presenta una alta afinidad por estos dos últimos átomos dadores, lo cual es de gran importancia desde el punto de vista de su mecanismo de acción, ya que esto hará que el fármaco tenga tendencia a unirse a los ácidos nucleicos de su diana farmacológica: el ADN. Pero además, cuando el cisplatino entra en el torrente

sanguíneo por vía intravenosa se une a diferentes biomoléculas del plasma sanguíneo, principalmente proteínas, de forma que sólo un 10 % del fármaco administrado se encuentra de forma libre circulando por la sangre [72,73]. Además, el fármaco puede unirse a diferentes especies biológicas como metalotioneínas, glutatión, tiosulfato, fosfoproteínas, fosfopéptidos y fosfolípidos de membrana [74]. Esta unión entre el fármaco y diferentes biomoléculas es de gran importancia, tanto para el cisplatino como para carboplatino y oxaliplatino, puesto que significa la pérdida de su actividad biológica, ya que sólo la fracción del fármaco que no está unido a proteínas es capaz de entrar en las células y producir su acción citotóxica [75,76]. De hecho, se ha calculado que sólo un 1% del cisplatino intracelular interacciona con su diana farmacológica [77].

En cuanto a su eliminación, el fármaco inalterado se excreta por vía renal, en una primera fase por filtración glomerular y posteriormente por secreción tubular. Este hecho está directamente relacionado con la nefrotoxicidad, como será explicado más ampliamente en el apartado 1.6. Se ha observado que entre un 10 y un 40% del fármaco administrado es eliminado en la orina tras las primeras 24 horas. Las especies que son excretadas en este punto corresponden al fármaco intacto, el monoacuo complejo, el complejo *cis*-[Pt(NH₃)₂Cl(creatinina)]⁺ y aductos formados con urea y ácido úrico [78]. La eliminación es trifásica, con una semi-vida media de la fase inicial (alfa) que dura entre 25 y 49 minutos, una segunda fase (beta) de excreción lenta en la que presenta una vida media de entre 2 y 5 días, y finalmente una tercera fase (anúrica) superior a 10 días. El fármaco puede ser detectado en la orina hasta 11 meses después de la terapia [79,80]. Sólo el 10% de la dosis se elimina en la bilis, y no son detectables restos del fármaco en las heces. Finalmente, el fármaco no excretado sigue circulando por el organismo distribuyéndose y acumulándose en los diferentes tejidos, encontrándose altas concentraciones en los riñones, el hígado y la próstata. También se acumula, aunque en menor extensión en el corazón, cerebro e intestino.

Como se ha comentado previamente, la toxicidad de los fármacos con base de platino está directamente relacionada con la facilidad de hidrólisis de sus grupos salientes. Así, los complejos platinados con ligandos salientes lábiles, como agua o nitrato, son altamente tóxicos con respecto a complejos con grupos salientes del tipo bis-carboxilatos, cuya hidrólisis es mucho más lenta. Así, el **carboplatino** fue diseñado para reducir la toxicidad producida por cisplatino mediante el reemplazo de los

ligandos cloruro del cisplatino por un ligando bidentado más estable a la hidrólisis, el 1,1-ciclobutanodicarboxilato (CBDCA), cuya constante de hidrólisis es 10^{-8} s^{-1} frente a los 10^{-5} s^{-1} del cisplatino [81], lo cual está directamente relacionado con su baja reactividad. Aunque el carboplatino es estable en medio acuoso y salino [82], también experimenta reacciones de hidrólisis [83]. Los productos de hidrólisis formados por el carboplatino en disolución son los que se muestran en la **Figura 5**. Puesto que los grupos amino son comunes con el cisplatino, la evolución del carboplatino en medio acuoso lleva a los mismos acuocomplejos formados por cisplatino, difiriendo únicamente en la velocidad de su formación. Debido a esta menor reactividad, las dosis recomendadas de carboplatino son de 20 a 40 veces superiores a las recomendadas para el cisplatino, llegando a alcanzar los 300 y 450 mg m^{-2} dependiendo del protocolo de administración [7]. La menor reactividad del carboplatino también limita el número de complejos formados con proteínas. Este fármaco también es eliminado mediante la orina, excretándose en gran medida intacto debido a la citada baja reactividad, eliminándose entre un 54 y 82% tras los primeros cinco días [84]. Las propiedades del carboplatino son un arma de doble filo. Por un lado, la menor relación de excreción que presenta el carboplatino hace que su retención en el organismo sea mayor, lo cual conduce a una vida media de retención de 30 horas, muy alta comparada con las 1,5 a 3,6 horas del cisplatino [85]. Sin embargo, su baja reactividad hace que casi un 90% del carboplatino intacto sea eliminado en la orina [86].

Por otro lado, el **oxaliplatino** suele administrarse como una infusión constante de entre 15 minutos y 6 horas. Las dosis administradas son mayores que para el cisplatino, de 20 a 180 mg m^{-2} dependiendo el tipo de tumor [87,88]. Este fármaco cruza rápidamente las membranas celulares debido a su carácter lipofílico, y también presenta reacciones de hidrólisis cuando se encuentra en medio acuoso o fisiológico. En la **Figura 6** se observan los productos de hidrólisis descritos en la bibliografía para oxaliplatino [89]. Cuando se trabaja con oxaliplatino, debe evitarse el empleo de soluciones salinas ya que pueden producirse modificaciones químicas y formación de precipitados. Por ello, al igual que el carboplatino, se administra disuelto en soluciones de glucosa 5%. Al igual que el cisplatino, el oxaliplatino presenta una fuerte interacción con las biomoléculas del torrente sanguíneo, de forma que a las 24 h de su

administración el 80% del Pt se encuentra unido a biomoléculas del plasma, y a las dos horas, el 40% del fármaco en la sangre se encuentra unido a los eritrocitos [90–92]. Diversos estudios *in vitro* han constatado que dicha unión es irreversible [93], y que no existe flujo de Pt desde los eritrocitos [89], por lo que estas células no actúan como almacenes de oxaliplatino activo. Finalmente, tras dos o cinco días tras el tratamiento del 30 al 50% del Pt es excretado en la orina [94]. El oxaliplatino se suele administrar de forma combinada con 5-fluorouracilo o leucovorina, ya que esta combinación produce un efecto sinérgico con una tasa de respuesta del 58% en tumores colorrectales metastásicos [95]. Además, en este año, estudios clínicos en Fase I han revelado una cierta eficacia en la administración combinada de oxaliplatino con S-1 e irinotecano en pacientes con adenocarcinoma ductal pancreático [96].

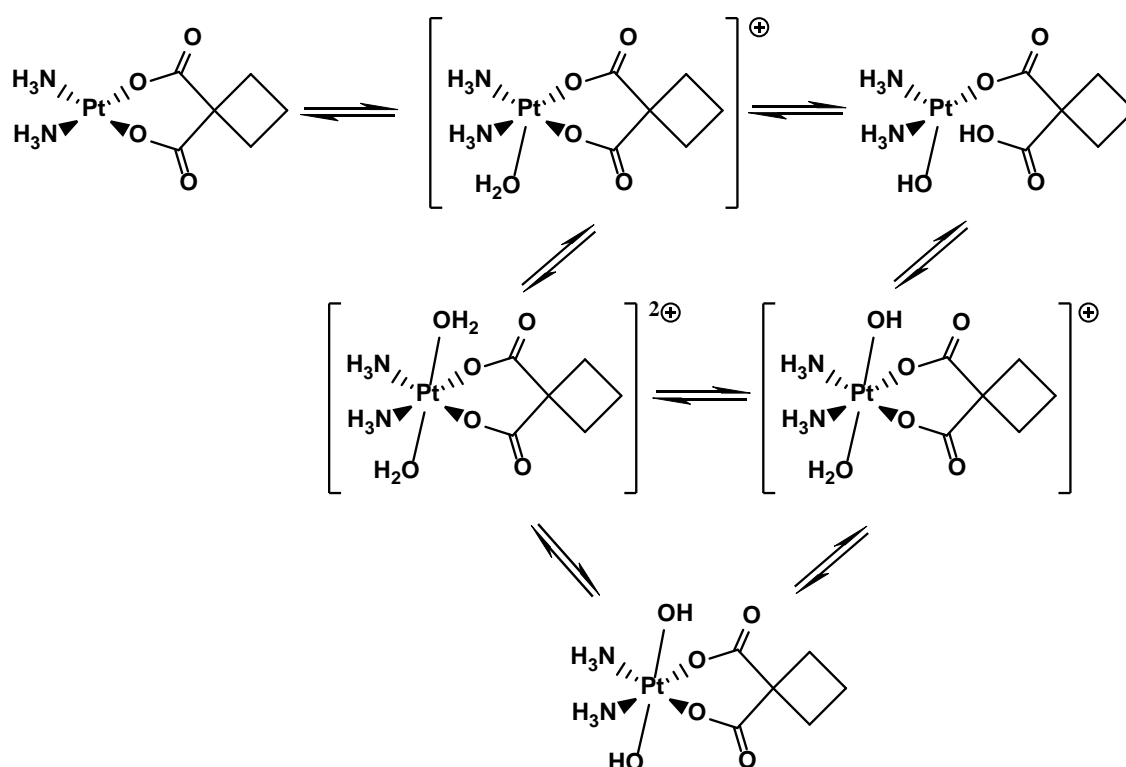


Figura 5. Hidrólisis del carboplatino en medio acuoso

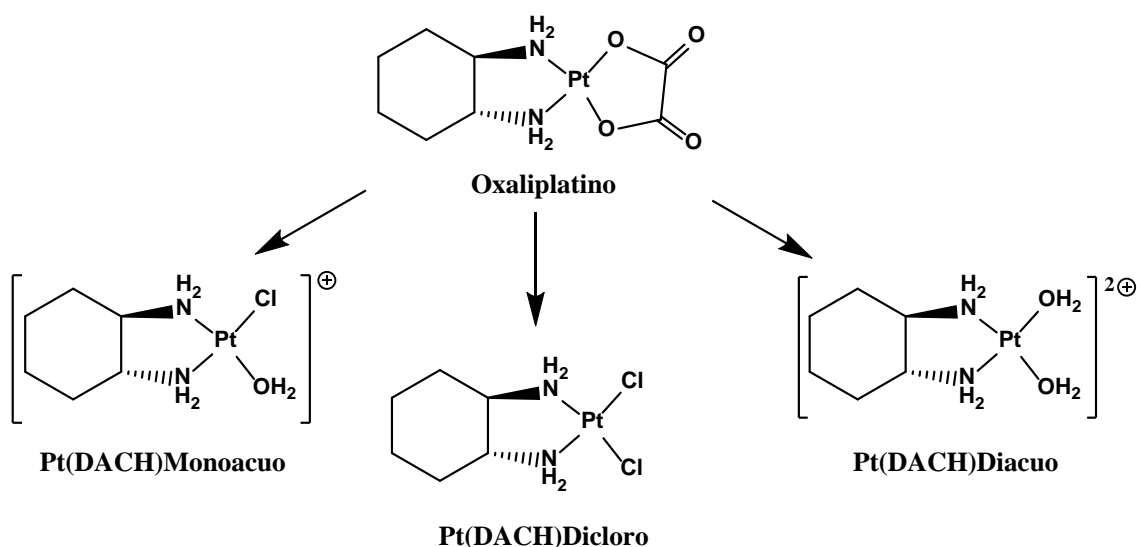


Figura 6. Hidrólisis del oxaliplatino en medio acuoso

En este punto, cabe destacar que a diferencia de otros compuestos orgánicos que son disueltos habitualmente en disolventes orgánicos, los fármacos antitumorales con base de Pt deben administrarse disueltos en disolventes acuosos: NaCl al 0.9% en el caso de cisplatino y disoluciones de glucosa al 5% para carboplatino y oxaliplatino. Aunque en algunos laboratorios se siguen utilizando disoluciones orgánicas de compuestos de Pt para estudios *in vitro*, es menos recomendable, ya que se han observado importantes disminuciones de la actividad citotóxica de cisplatino cuando éste se encuentra disuelto en disolventes orgánicos como el dimetilsulfóxido (DMSO) [97].

1.3.1 Nuevas estrategias para la administración de fármacos platinados

En los últimos años se han abordado nuevas líneas de investigación enfocadas a poner solución a los siguientes problemas asociados al tratamiento con fármacos antitumorales con base de Pt: i) la rápida unión de los fármacos a las proteínas y péptidos del torrente sanguíneo y su transformación intracelular, y/o ii) la baja selectividad de los fármacos entre tejidos cancerosos y sanos.

La posible solución al primero de estos problemas y, por tanto, uno de los objetivos de estas nuevas líneas de investigación consiste en la administración de los fármacos platinados encapsulados en la cavidad hidrofóbica que presentan algunos

macrociclos orgánicos como los cucurbit[n]urilos (CB[n]), las n-ciclodextrinas o los calix[n]arenos, siendo los primeros los más estudiados. En total, se han realizado ensayos con más de 15 fármacos con base de Pt ligados a cucurbit[n]urilos, incluyendo cisplatino y oxaliplatino [98]. En este punto se han obtenido resultados prometedores para el cisplatino, observándose una menor reactividad del fármaco con proteínas y péptidos debido a su encapsulación en la cavidad de CB[7], aumentando por tanto su efectividad [99]. Resultados similares se han encontrado en el caso de la administración de oxaliplatino encapsulado, observándose una reactividad 15 veces inferior a la del oxaliplatino normal frente a la metionina [100].

En relación al otro de los principales problemas que presentan los fármacos con base de Pt, la baja selectividad entre los tejidos sanos y cancerosos, surgen otros nuevos métodos de administración basados en el **transporte pasivo o activo** de los fármacos antitumorales. El primero de ellos consiste en el desarrollo de nanomateriales que permitan vehiculizar los fármacos antitumorales al lugar deseado, aumentando la biodisponibilidad del agente activo en el tejido diana. Muchos de estos sistemas nanotransportadores selectivos de fármacos se diseñan en base al efecto conocido como “efecto de permeabilidad y retención aumentada” (“EPR”) [101–105]. Este efecto se basa en las diferentes características que presentan los tejidos sanos frente a los tejidos tumorales, donde el tejido vascular se encuentra alterado. Cuando un tejido tumoral alcanza un determinado tamaño, se induce el proceso de angiogénesis para satisfacer la mayor demanda de nutrientes y oxígeno que necesita el tumor en crecimiento. Esto da lugar a una neovasculatura totalmente diferente a la existente en tejidos sanos. Por ejemplo, la luz de los vasos tumorales es más ancha, mientras que el drenaje linfático es deficiente. Esta anomalía, junto con otras anomalías funcionales, hace que exista una mayor permeabilidad de los componentes de interés (en este caso el complejo fármaco-nanopartícula) del plasma sanguíneo. Por otra parte, el lento retorno venoso y el pobre aclaramiento linfático hacen que las nanopartículas con el fármaco de interés sean retenidas en el tumor.

En este punto, se han desarrollado numerosos nanotransportadores para la difusión pasiva de fármacos con base de Pt, entre los que se incluyen micelas y liposomas, algunos polímeros, dendrímeros, proteínas, nanopartículas metálicas o nanotubos de carbono. A continuación se describen brevemente algunos de ellos:

- El **Aroplatino** y el **SPI-77** se basan en formulaciones de liposomas que estuvieron bajo evaluación clínica pero que no recibieron la aprobación para su uso en humanos. Mientras que el desarrollo del aroplatino fue interrumpido por cuestiones puramente económicas, el compuesto SPI-77 no superó los ensayos clínicos de fase II en pacientes debido a la ineficiente liberación del cisplatino desde el liposoma [6].

- Tras el fracaso del SPI-77, la empresa Liplasome Pharma desarrolló el **LiPlaCis**, una formulación liposomal de cisplatino encapsulado en éteres lipídicos. Este liposoma fue diseñado de forma que la liberación del cisplatino dentro de las células tumorales se produce tras su degradación mediante la enzima fosfolipasa A2 (sPLA2), la cual se encuentra sobre-expresada en numerosos tejidos cancerosos, lo que le confiere al fármaco una gran selectividad entre los tejidos tumorales y sanos. Siguiendo este concepto, se desarrolló el fármaco LiPloxa, similar al anterior pero conteniendo una molécula de oxaliplatino. Desafortunadamente, en los ensayos clínicos realizados para LiPlaCis en pacientes con cáncer de pecho avanzado no se han encontrado grandes beneficios con respecto al cisplatino [106].

- El **Lipoplatino**, comentado anteriormente en el apartado A.1.2.6, también se incluiría dentro de los fármacos administrados mediante transporte pasivo, siendo una formulación liposómica.

- La vehiculización de fármacos a través de **dendrimeros** ha demostrado cierto éxito [107]. Los dendrimeros son capaces de unirse a los fármacos de diferentes formas, incluyendo desde interacciones electrostáticas hasta por inmovilización química de éstas en su superficie. En el caso de los fármacos con base de Pt, los dendrimeros más utilizados son los de poliamidoamina (PAMAM) [108,109]. El mayor problema en el empleo de dendrimeros es la unión irreversible que suele producirse entre el fármaco y las ramificaciones del polímero.

- Respecto a la vehiculización de fármacos con base de Pt ligados a **proteínas**, se ha observado que la **transferrina** puede actuar potencialmente como “vehículo”. La gran utilidad de esta proteína reside en el hecho de que diversos tipos de cáncer sobre-expresan los receptores de transferrina en la superficie de sus células, facilitando así el acceso de los fármacos a las células tumorales.

- Las **nanopartículas** sintetizadas a partir de elementos metálicos como oro, platino u óxido de hierro también han sido utilizadas como “vehículos”.

Concretamente, las nanopartículas de oro y óxido de hierro han sido estudiadas para vehiculizar antitumorales de platino. Sin embargo, se ha observado que el débil enlace producido entre las nanopartículas de oro y el fármaco origina una considerable pérdida del fármaco cuando éste se encuentra con el ambiente altamente salino del suero sanguíneo [110]. Por ello, los fármacos platinados suelen ser inmovilizados en la superficie de las nanopartículas empleando enlazadores químicos que contienen tioles [111].

- Recientemente también está siendo estudiado el empleo de **nanotubos de carbono** para el transporte de fármacos. Los nanotubos de carbono transportan el fármaco de diferentes formas: i) el fármaco es almacenado en la cavidad del nanotubo; ii) el fármaco se une a la superficie de nanotubos mediante la funcionalización de éstos con grupos carboxílicos o aminos; iii) el fármaco se une mediante el empleo de un inmovilizador químico. Estudios realizados con cisplatino, nedaplatino, carboplatino y oxaliplatino han demostrado que estos fármacos pueden ser encapsulados en el interior de la cavidad de los nanotubos [112].

En este punto cabe destacar que no sólo los fármacos antitumorales con base de platino han sido administrados mediante el empleo de la nanotecnología, sino también otros tipos de fármacos antitumorales como paclitaxel, doxorubicina, 5-FU, o dexametasona [113,114].

Como alternativa al transporte pasivo surge el **transporte activo** (del inglés “**active drug targeting**”), que consiste en la coordinación del fármaco a agentes activos como nutrientes, proteínas, anticuerpos o aptámeros que son reconocidos selectivamente por receptores situados en la superficie de las células tumorales. Al encontrarse dichos receptores sobre-expresados en las células tumorales, se facilita así el acceso del fármaco a dichas células.

Todas estas nuevas metodologías de formulación de fármacos antitumorales con base de platino han presentado resultados prometedores, pero no han llegado a proporcionar aún ninguna formulación que sea comercializable. Una posible explicación del poco éxito conseguido podría ser debida a problemas surgidos en la administración de dichos fármacos, desconocimiento de la ubicación y tiempo de eliminación del fármaco, y la toxicidad inherente que presentan algunos de los “vehículos” estudiados.

1.4 Mecanismos de acción

Aunque los mecanismos de acción de los fármacos antitumorales con base de Pt no están completamente dilucidados, numerosas investigaciones apuntan a que la citotoxicidad que presentan estos fármacos es debida a su interacción con el ADN, ya que se han observado correlaciones entre ésta y la cantidad de Pt unido al ADN [115]. Como se ha comentado anteriormente, una vez que el fármaco entra en el interior celular, la baja salinidad del citoplasma origina la hidrólisis del fármaco generando acuocomplejos mucho más reactivos. Estos acuocomplejos, aunque pueden reaccionar con diversas biomoléculas como ya ha sido comentado, interaccionan con su principal diana, el ADN. Los compuestos formados tras dicha interacción, denominados “aductos Pt-ADN” originan una modificación de la estructura tridimensional del ADN que impide su replicación y transcripción, produciendo el correspondiente efecto citotóxico.

A continuación, se explicarán más detenidamente los mecanismos de transporte al interior celular, la interacción con el ADN y otras biomoléculas, y la respuesta celular generada tras producirse el efecto citotóxico.

1.4.1 Internalización y extrusión celular

Actualmente, la bibliografía describe diversos mecanismos involucrados en el transporte de los fármacos con base de Pt al interior celular. Originalmente fue propuesto como mecanismo para la entrada al interior de la célula la **difusión pasiva**, con una velocidad dependiente de su lipofilia. Aunque este mecanismo parece ser el predominante, es un mecanismo inespecífico que no logra explicar la toxicidad específica que presenta por ejemplo el cisplatino [116]. Sin embargo, existen también diversos transportadores de membrana involucrados tanto en la entrada de los fármacos a la célula como en su excreción. Algunos de estos transportadores de membrana son específicos de ciertos tejidos, e incluso se localizan en los tejidos epiteliales, dichos transportadores se encuentran expresados específicamente en las membranas basolateral o apical. El estudio de la interacción entre estos transportadores y los fármacos platinados resulta de gran interés, ya que se ha demostrado que estos procesos de transporte están involucrados tanto en la

disposición de los fármacos como en su acumulación, eficacia terapéutica y efectos secundarios [117–119]. A continuación, se resumirán los aspectos más importantes de la interacción de los fármacos con base de platino y los principales transportadores transmembrana, los cuales se encuentran resumidos en la **Figura 7**.

- **Transportadores de cobre (CTRs):** Según la “*Human Genome Organisation*” (*HUGO*) los transportadores de cobre pertenecen a la familia SLC31A [120]. En concreto, el **CTR1** (SLC31A1) se encuentra expresado de forma ubicua en todos los tejidos, siendo particularmente abundante en los túbulos renales, el plexo coroideo y tejidos conectivos de ojos, ovarios y testículos [121]. La interacción producida entre las especies de Pt y este transportador de carácter proteico es debida a que éste presenta un entorno rico en proteínas en su extremo N-terminal, a las cuales puede coordinarse el Pt [122,123]. Numerosos estudios reportan el transporte de los fármacos con base de Pt mediado por este transportador [124–126], habiéndose relacionado la presencia de este transportador con la acumulación de los diferentes fármacos en el organismo. Concretamente, se ha demostrado que la inhibición de CTR1 tanto en levaduras como en fibroblastos embrionarios de ratón resulta en una reducción de la entrada de cisplatino del 80% [127,128]. Además, estudios *in vitro* sugieren una relación entre la presencia de los transportadores de cobre con la aparición de resistencia a cisplatino. Cabe destacar que tanto cisplatino como carboplatino y oxaliplatino son sustratos de este transportador [125]. Por otro lado, el **CTR2** presenta homología estructural con el CTR1, pero difiere en su distribución celular, ya que el CTR2 no sólo se localiza en la membrana plasmática [129] sino también en los endosomas y lisosomas [130]. Presenta las mismas propiedades que CTR1 con respecto a su capacidad para regular la acumulación intracelular y la citotoxicidad de cisplatino y carboplatino, y estudios con líneas celulares de carcinoma de ovario humano han revelado una correlación muy significativa entre la expresión de este transportador y la resistencia a cisplatino [130].

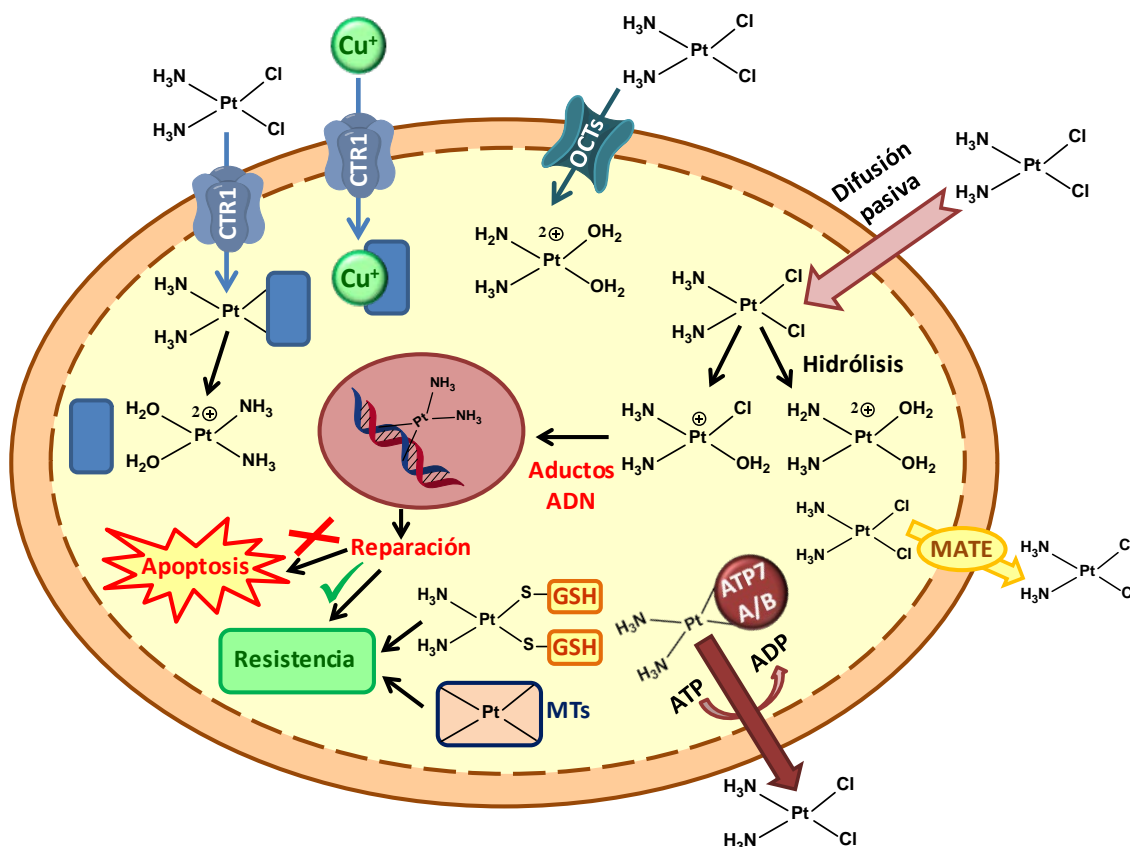


Figura 7. Transporte de los fármacos antitumorales con base de Pt en la célula

- **Transportadores de cationes orgánicos (OCTs):** El grupo de transportadores de cationes orgánicos pertenece a la familia SLC22 y consta de tres miembros: **OCT1**, **OCT2** y **OCT3**. Los sustratos reportados para estos transportadores incluyen neurotransmisores monoamino, diversos xenobióticos y fármacos. OCT1 y OCT2 se encuentran expresados fundamentalmente en la membrana basolateral de hepatocitos de hígado y en el tejido epitelial del túbulo proximal de riñón humano respectivamente, mientras que OCT3 se encuentra prácticamente expresado de forma ubicua en hígado, placenta, riñón, corazón y el músculo esquelético [131]. La primera evidencia de que los OCTs jugaban un papel importante en el transporte celular de cisplatino surgió tras unos experimentos en los que se observó que la entrada celular de tetraetilamonio (un sustrato modelo de los OCTs) en células NIH3T3 transfectadas con OCT2 era inhibida competitivamente por el cisplatino [132]. Además, la naturaleza vectorial de este transporte fue demostrada en experimentos *in vitro* con células epiteliales de túbulo proximal en los que se observó que el transporte de cisplatino de

la membrana basolateral a la apical era mayor que en sentido contrario [133]. En la bibliografía se encuentran numerosos estudios que describen la importancia de la expresión de estos transportadores en relación con diversos efectos secundarios inducidos por los fármacos con base de Pt, tales como la neurotoxicidad, nefrotoxicidad, etc. Por ejemplo, se ha demostrado que OCT2 se encuentra expresado en las células ganglionares de la raíz dorsal en el sistema nervioso, donde ha sido demostrada una mayor acumulación de oxaliplatino. Además, se ha observado una entrada celular de oxaliplatino de 28 a 35 veces mayor de lo habitual en células que sobre-expresan dicho transportador, siendo dicho proceso directamente relacionado con una mayor platinación del DNA y la citotoxicidad inducida por oxaliplatino [134–136]. Por otro lado, diferentes autores afirman que la nefrotoxicidad inducida por cisplatino (debido principalmente a su acumulación en las células epiteliales del túbulo proximal) está directamente relacionado con su transporte al interior celular mediante el OCT2 [117,137].

- **ATP7A y ATP7B:** Otros transportadores responsables de la regulación del nivel de cobre en las células son las bombas ATPasas de tipo P ATP7A y ATP7B. La proteína **ATP7A** se encuentra expresada en el intestino y el plexo coroideo, en células del músculo liso vascular, células endoteliales vasculares y en la aorta, así como en las células endoteliales cerebro-vasculares. Por otro lado, **ATP7B** se expresa en el hígado y cerebro. Además, estas dos proteínas se encuentran coexpresadas en el cerebro, riñón, pulmones, placenta y en las glándulas mamarias [138]. Estos transportadores son responsables del transporte del cisplatino, carboplatino y oxaliplatino al exterior celular, o su transporte a compartimentos subcelulares específicos [139,140]. La primera evidencia de la relación entre los transportadores ATP7 y la sensibilidad celular a cisplatino se produjo tras un estudio en el cual se observó un incremento de la resistencia a cisplatino de una serie de líneas celulares transfectadas con el gen que codifica la proteína de ATP7B con respecto a células control, observándose además una menor acumulación y mayor eliminación del fármaco en las células transfectadas [141]. Además, se ha observado una sobre-expresión de ATP7B en células de carcinoma de próstata y sobre-expresión tanto de ATP7A como de ATP7B en tres líneas celulares de carcinoma de ovario humano resistentes a cisplatino [141,142].

• **MATE:** Estos transportadores participan en una importante función biológica, la secreción de xenobióticos y fármacos desde los túbulos proximales renales. Se han identificado dos transportadores MATE (del inglés "*Multidrug And Toxin Extrusion*"), MATE1 y MATE2, siendo asignados al grupo SLC47 [143]. Su caracterización funcional demostró que se comportan como antiportadores de H^+ / cationes orgánicos [144]. El hMATE1 mRNA se encuentra expresado fundamentalmente en el riñón, la glándula suprarrenal, el hígado y el músculo esquelético entre otros tejidos [145,146]. Por otro lado, el MATE2-K (una variante del MATE2) presenta una expresión específica en el riñón humano. Ambos transportadores se detectan en niveles similares en el riñón, y se localizan en la membrana apical de los túbulos proximales [144,146]. Por ello, juegan un papel fundamental en la secreción tubular de fármacos catiónicos. Con respecto a esta secreción tubular, ha sido demostrado que ambos transportadores secretan el cisplatino y oxaliplatino desde los túbulos proximales a la orina, disminuyendo así su acumulación en los mismos. Yonezawa *et al.* describen el transporte de cisplatino fundamentalmente mediante el hMATE1, mientras que oxaliplatino es transportado con mayor eficiencia por el hMATE2-K. Sin embargo, se ha observado que el carboplatino no es sustrato de estos transportadores [147]. Es por ello que recientemente se ha sugerido que estos transportadores juegan un papel fundamental en la eliminación celular de estos fármacos, siendo su expresión determinante en la nefrotoxicidad inducida por los fármacos con base de Pt [144].

Finalmente, cabe destacar la gran importancia que existe entre la estructura química de los fármacos con base de Pt con la especificidad que presentan los transportadores mencionados anteriormente, ya que este hecho está directamente relacionado con la diferente toxicidad que presentan cada uno de los fármacos con base de Pt estudiados. En este punto, son numerosos los estudios que existen evaluando la relación existente entre la diferencia en el transporte y el diferente comportamiento nefrotóxico de los fármacos con base de Pt. Así, la diferente especificidad que presenta OCT2 por cisplatino, carboplatino, oxaliplatino y nedaplatino ha sido directamente relacionada por diversos autores con el diferente comportamiento nefrotóxico entre dichos fármacos [117,137,147,148] (**Figura 8**).

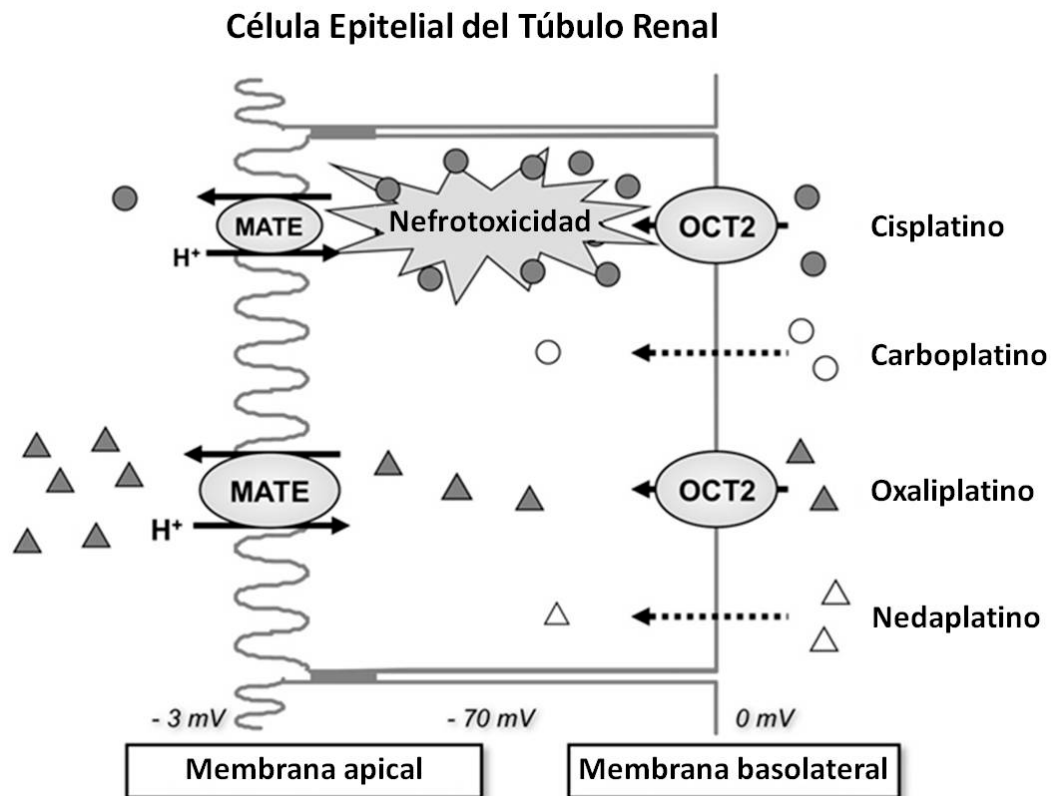


Figura 8. Transporte de cisplatino, carboplatino, oxaliplatino y nedaplatino en una célula epitelial del túbulo proximal renal. Adaptado de Yonezawa et al. [117]

1.4.2 Interacción con su diana farmacológica: el ADN

Los productos de hidrólisis de los fármacos con base de Pt generados en el interior celular presentan gran afinidad por átomos dadores de electrones. Por ello, la interacción producida entre estos fármacos y el ADN tiene lugar a través de los nitrógenos de las bases nitrogenadas. Fundamentalmente, la interacción se produce con aquellas bases que no están formando puentes de hidrógeno. Así, la primera interacción se da entre el monoacuo-complejo $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{ClH}_2\text{O}]^+$ y el nitrógeno de la posición 7 (N7) de las bases púricas adenina (A) y guanina (G) (**Figura 9**) [149–151]. Estos átomos en posición 7 son los más accesibles para que se produzca el ataque nucleófilo, siendo la cinética de dicha reacción bastante favorable [152,153]. De hecho, en la bibliografía se ha reportado que la etapa limitante de la interacción entre los fármacos con base de Pt y el ADN es la reacción de hidrólisis de los fármacos originales [154].

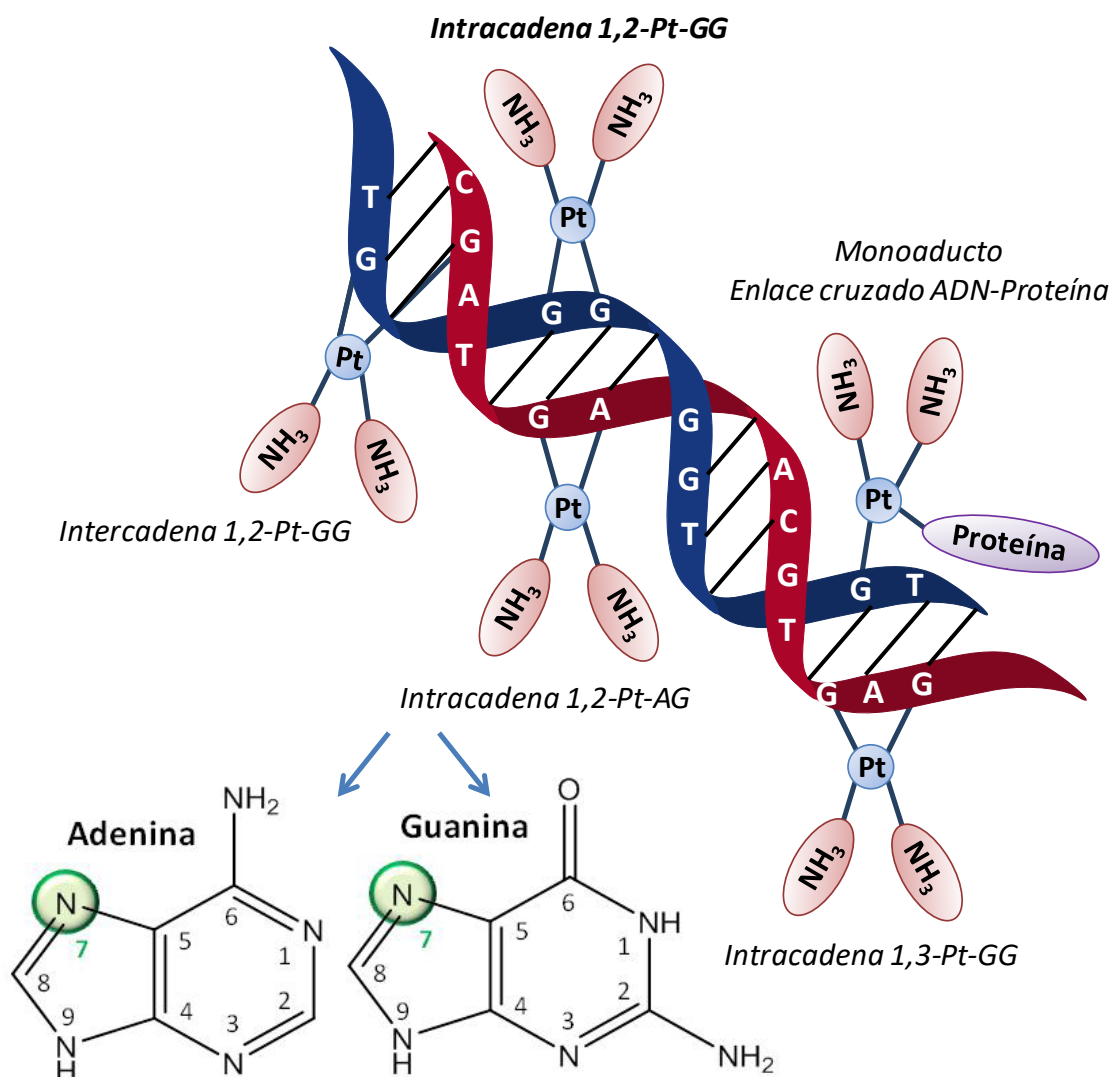


Figura 9. Arriba, principales aductos del cisplatino, carboplatino y nedaplatino con el ADN. En negrita se señala el aducto formado predominantemente. Abajo, bases nitrogenadas de adenina y guanina. En verde se resalta el N en posición 7 a través del cual se coordinan al Pt

Una vez se ha formado el monoadducto, el complejo se cierra tras la unión a un segundo nucleótido, formando los aductos bifuncionales. Estos aductos pueden formarse con bases púricas de la misma cadena (intracatenarios), o bases cercanas de las dos hebras (intercadenarios) [155,156], habiéndose descrito en la bibliografía que el porcentaje de coordinación es mayor cuando existen dos guaninas contiguas en la misma cadena [152,153]. De hecho, se ha calculado que este aducto (*cis*-1,2,[Pt(NH₃)₂]²⁺-d(GpG)) representa el 65% de todas las especies [157]. En la **Figura 9** se muestran las estructuras de los principales aductos formados por el cisplatino,

carboplatino y nedaplatino (los cuales tienen en común los ligandos fijos amino) con el ADN.

Estos aductos son reconocidos por proteínas específicas que reconocen el daño al ADN y generan una serie de reacciones para la reparación de la doble hélice, como se explicará más adelante. Sin embargo, si dicha reparación no se produce, los aductos bifuncionales producen una modificación tridimensional en la estructura del ADN generando una flexión de la doble hélice hacia el surco mayor (de 32-35° para cisplatino y carboplatino, y mayor para el oxaliplatino) y el consiguiente desenrollamiento [11]. Este hecho produce la inhibición de los procesos de replicación y transcripción del ADN, lo que conduce a la muerte celular por apoptosis [158,159].

A pesar de que los aductos formados por el **carboplatino** con el ADN son los mismos que con el cisplatino (**Figura 9**), su menor reactividad hace necesario el suministro de altas dosis durante el tratamiento con este fármaco, siendo unas 20-40 veces superiores a las administradas para cisplatino [157]. A pesar de esto, la tasa de formación de aductos del carboplatino con el ADN es de unas diez veces más lenta [154]. Al igual que sucede con el cisplatino, el primer producto de reacción del carboplatino con el ADN es el aducto monofuncional, el cual posteriormente puede reaccionar convirtiéndose en aductos bifuncionales. El hecho de que la reacción principal sea monofuncional sugiere que el monoacuocomplejo de carboplatino es la especie reactiva principal [154]. Debido a que la constante de hidrólisis de los grupos salientes del carboplatino es menor, se necesita una dosis de carboplatino 100 veces superior a la del cisplatino para producir una cantidad de enlaces equivalentes al ADN. Sin embargo, se ha demostrado que una vez que la cantidad de enlaces al ADN es del mismo orden, cisplatino y carboplatino presentan las mismas lesiones, enlaces intercadena y citotoxicidad [154]. En este punto, Natarajan *et al.* observaron una mayor reactividad en la unión del carboplatino a las cadenas de ADN empleando nucleófilos como tiourea y glutatión [85]. Finalmente, con respecto a la citotoxicidad del carboplatino, ha sido demostrado que la única diferencia con respecto al cisplatino es debida exclusivamente a su diferente farmacocinética [154].

Por otro lado, debido a las características que presenta el grupo diaminociclohexano del **oxaliplatino**, los aductos formados entre este fármaco y el ADN son mucho más voluminosos e hidrófobos que los formados con cisplatino,

carboplatino y nedaplatino. Es por ello que la modificación que se produce en la estructura del ADN es mucho más importante, lo cual hace que la inhibición en la replicación del ADN sea mucho más eficaz [160,161]. Este hecho explica que el oxaliplatino presente actividad en tumores que poseen resistencia intrínseca o adquirida al cisplatino [89], posiblemente debido a que las características de los aductos formados con el ADN obvian alguno de los mecanismos de resistencia del cisplatino, como por ejemplo la reparación del daño de la cadena de ADN [94].

1.4.3 Respuesta celular

Una vez formados los aductos Pt-ADN, existen una serie de complejos proteicos enzimáticos especializados en **reconocer el daño** en la doble hélice, los cuales reconocen dichos aductos y desencadenan una serie de mecanismos para reparar el daño producido [162]. En el caso de que fallen estos mecanismos de reparación, se producirán cascadas de señalización apoptótica que conllevarán a la muerte celular [163].

A continuación se describen brevemente los **procesos de reparación del ADN** existentes, los cuales se basan en la escisión de la región dañada (seguida del reemplazamiento preciso), reparaciones de errores durante la replicación o reparación de roturas en la doble hélice:

- **Reparación por escisión de nucleótidos (“Nucleotide Excision Repair”, NER):**

Consiste en el principal mecanismo de reparación, en el cual los aductos Pt-ADN son reconocidos y eliminados mediante un desenrollamiento del ADN y posterior escisión de la secuencia de oligonucleótidos modificados [158]. Es un mecanismo complejo, en el que intervienen más de 20 proteínas diferentes. En la bibliografía se describe el hecho de que células bacterianas y mamíferas deficientes en las proteínas involucradas en este mecanismo son más sensibles a los fármacos con base de Pt [164]. Además, se ha reportado una expresión 2 veces superior de los genes que codifican proteínas del NER (como XPC, XPA y ERCC1) en líneas celulares tumorales resistentes a cisplatino [165], así como una mayor expresión de dichas proteínas en tejidos de cáncer de ovario de pacientes clínicamente resistentes a cisplatino y carboplatino [166]. Se ha

demostrado que mediante este mecanismo los aductos intercadena 1,2-Pt-GG y 1,2-Pt-AG son reparados de forma menos eficiente que los aductos 1,3-Pt-GG, poniendo de manifiesto la relación de los aductos 1,2 con la citotoxicidad de los fármacos platinados [167–169]. Sin embargo, se ha propuesto que la reparación de los aductos intercadena requiere tanto la vía NER como el mecanismo de recombinación homóloga [170].

• **Reparación de apareamientos erróneos (Mismatch Repair (MMR)):** Éste es otro de los sistemas de reparación del daño producido al ADN, por el cual se reconocen los apareamientos erróneos producidos durante la replicación del ADN, se eliminan, y se produce la síntesis de forma correcta [171]. Algunos estudios indican que existe una correlación entre el funcionamiento de dicho mecanismo y la resistencia a cisplatino [172–174]. Por ejemplo, se ha observado que líneas celulares que presentan resistencia (bien intrínseca o bien adquirida) a cisplatino presentan deficiencias en este mecanismo [175,176]. Se ha descrito que las proteínas involucradas en este mecanismo se unen con mayor afinidad a los aductos cisplatino-GG que a los aductos oxaliplatino-GG [177], lo cual podría contribuir a las diferentes citotoxicidades y rango de aplicabilidad observados para dichos fármacos.

• **Reparación por síntesis de translesión:** Englobado en los mecanismos que reparan los errores de replicación, consiste en la replicación translesión (sintetizan ADN nuevo a partir del sitio de la lesión) de la cadena de ADN mediante la “toleración” del daño inducido por el fármaco. Mientras que las ADN polimerasas de replicación clásicas (α , δ , y ϵ) no pueden pasar por alto la lesión producida, existen ciertas polimerasas (β , h , ι y ζ) que consiguen evitar las lesiones intracadena mediante la síntesis de translesión [178–182]. En este punto, diversos autores han descrito una resistencia al cisplatino relacionada con la sobreexpresión de la β -polimerasa [183], así como un aumento de la sensibilidad a cisplatino, carboplatino y oxaliplatino por ausencia de la η -polimerasa [184].

• **Reparación por recombinación homóloga:** Este mecanismo ha sido propuesto como el principal mecanismo por el cual se produce la reparación de roturas en la doble hélice inducidas por la generación de aductos Pt-ADN [185]. Se trata de una recombinación genética durante los ciclos de replicación en la que las secuencias de nucleótidos dañadas son intercambiadas entre la cadena de ADN dañada y cadenas similares o idénticas de ADN no dañado. Mediante este mecanismo suelen repararse los aductos intercadena. Se ha pensado que las proteínas XPF y ERCC1, participantes en el mecanismo de reparación NER, también están involucradas en este mecanismo [186,187]. Además, ha sido descrito en la bibliografía un aumento en la sensibilidad a cisplatino en líneas celulares que presentan una recombinación impedida [188].

1.4.4 Interacción con otras biomoléculas

Como se ha comentado anteriormente, tanto en el torrente sanguíneo como en el citoplasma celular existen numerosas biomoléculas diferentes al ADN que pueden interactuar con los fármacos con base de Pt. Estas biomoléculas pueden ser diferentes proteínas, oligopéptidos como el glutatión, metalotioneínas (MTs), aminoácidos sulfurados como cisteína y metionina, o aniones fosfato o carboxilato. A continuación, se describen los aspectos generales de dichas interacciones:

- **Interacciones con proteínas del torrente sanguíneo:**

Debido a la administración por vía intravenosa de estos fármacos, su interacción con los componentes del torrente sanguíneo ha sido ampliamente estudiada [189,190]. Existen diversos estudios enfocados a la caracterización estructural de los complejos formados entre el Pt y las proteínas [72,73,191,192]. Principalmente, han sido estudiadas las interacciones con proteínas del plasma como la albúmina de suero humana (HSA) y la transferrina (TF) [193,194], u otras proteínas como la lisozima [195], hemoglobina (Hb) [196], citocromo c [197], ubiquitina [198], MTs [199] o la superóxido dismutasa [200]. Habitualmente se ha pensado que la fracción del fármaco unido a dichas proteínas es excretado por la orina. Sin embargo, algunos autores mantienen que las proteínas actúan como almacén de los complejos de Pt [70].

Con respecto a la **coordinación entre cisplatino y proteínas**, se ha descrito que la interacción de cisplatino con Hb se produce en mayor proporción que con el resto de proteínas del torrente sanguíneo [201]. Sin embargo, el estudio de la interacción de la HSA con los fármacos platinados es de gran importancia, ya que debido a la gran abundancia de esta proteína en el suero es una de las principales dianas para el fármaco. Son numerosos los trabajos donde se ha estudiado la estequiometría y cinética de la interacción entre el cisplatino y la **HSA** [202,203]. Sin embargo, debido a que el enlace entre cisplatino y HSA depende de numerosos factores (relación fármaco:proteína, medio y tiempo de incubación, entre otros), los resultados de dichos estudios no coinciden completamente. En este punto, se ha descrito que un mol de HSA puede llegar a unir hasta ocho moles de cisplatino. Esta elevada estequiometría sugiere que existan diferentes puntos de unión en la estructura tridimensional de la HSA, lo cual ha sido estudiado por diversos autores. Aunque inicialmente se atribuía al residuo de Cys34 (la única cisteína que no está formando puentes disulfuro en la secuencia) como el principal punto de unión del cisplatino a la albúmina, Ivanov *et al.* fueron los primeros en poner de manifiesto la existencia de otros puntos de unión importantes que presentan residuos de metionina (Met) o histidina (His) en la secuencia de HSA [194]. Mediante ensayos por RMN estos autores identificaron la Met298 como el residuo sulfurado con mayor afinidad por el cisplatino. Recientemente, estos puntos de unión entre el cisplatino y la HSA han sido estudiados por diferentes autores mediante técnicas de espectrometría de masas [204–206], observándose diferentes puntos de unión alternativos, que presentan fundamentalmente residuos de Met, His, tirosina (Tyr) y ácido aspártico (Asp). Por otro lado, Hu *et al.* postularon la posibilidad de que el cisplatino pudiera entrecruzar los dominios I y II de la HSA mediante la unión a los residuos His67 e His247, ocupando así el mayor sitio de unión del Zn a esta proteína [204].

Otras proteínas presentes en el torrente sanguíneo y capaces de interaccionar con los fármacos con base de Pt son la **TF** y la **Hb**. Aunque la **TF** parece no interaccionar intensamente con los fármacos platinados [207], han sido identificados diversos puntos de unión al cisplatino que incluyen residuos de treonina (Thr), ácido glutámico (Glu) y Met [205,206]. En este punto, cabe destacar que los puntos de unión del cisplatino a la TF son diferentes a los puntos de unión para el Fe, lo cual supondría el

46

mantenimiento de la actividad biológica de la proteína [189]. Además, debido a la mayor demanda de Fe que presentan las células tumorales, la unión de cisplatino a TF podría suponer la vehiculización asistida del fármaco hacia los tumores. Por otra parte, la **Hb** presenta una alta interacción con los fármacos con base de Pt. Estudios realizados por Mandal *et al.* mediante SEC-ICP-MS y nESI-MS pusieron de manifiesto la diferente afinidad de cisplatino, oxaliplatino y carboplatino por la Hb, encontrándose que el orden de reactividad de estos fármacos con la proteína es el siguiente: oxaliplatino > cisplatino > carboplatino [208]. En estudios realizados por los mismos autores donde se incubaron muestras de sangre de pacientes voluntarios con los tres fármacos, se identificaron mediante SEC-ICP-MS tres especies Pt:Hb, de las cuales sólo una de ellas contenía Fe. Este hecho refleja una pérdida del grupo *hemo* durante la coordinación de la proteína a los fármacos, lo que puede suponer una disminución de la capacidad de la proteína para el transporte de oxígeno y, por tanto, podría traducirse en diversos efectos secundarios. Mediante incubaciones de Hb con concentraciones terapéuticas de cisplatino Mandal *et al.* también identificaron mediante análisis por nanoESI-MS fragmentos correspondientes a aductos $\text{Pt}(\text{NH}_3)_2\text{-Hb}$ [209], y reportaron que la formación de dichos complejos incrementa con la concentración de Hb (1-8 μM) [196]. Recientemente, se han identificado mediante nanoESI-Q-TOF dos aductos oxaliplatino:Hb, el $[(\alpha\text{h}\beta\text{h})_2\text{-oxaliplatino}]$ y $[(\alpha\text{h}\beta\text{h})_2\text{-Pt-DACH}]$ [92].

El **oxaliplatino** también presenta una fuerte interacción con las proteínas del torrente sanguíneo, de forma que tras 24 h de la administración, el 80% del Pt se encuentra unido a biomoléculas del plasma [89]. Uriens *et al.* [210] observaron en ensayos de incubaciones de este fármaco con suero sanguíneo una unión covalente entre el fármaco y las proteínas de entre el 79 y el 87%. Mediante estudios de especiación por SEC-ICP-MS de pacientes tratados con oxaliplatino [90], se ha encontrado que un 40% del oxaliplatino presente en el plasma eluye en la banda cromatográfica de 160-200 kDa (lo cual se relaciona con la unión a las γ -globulinas), otro 40% en la banda de 60 kDa (coincidente con el peso molecular de la HSA), y menos de un 15% eluye por debajo de los 2 kDa.

Por otro lado, debido a la menor reactividad que presenta el **carboplatino**, son pocos los trabajos que existen donde se evalúen las interacciones de éste con las

proteínas de la sangre. En cuanto a la interacción de este fármaco con biomoléculas del plasma sanguíneo, se ha encontrado que la mayor parte del fármaco se encuentra en la fracción líquida del plasma tras su administración [72]. Recientemente, diversos autores estudian la interacción de carboplatino con proteínas como HSA, TF, etc. Como ejemplo, citar el trabajo de Xie *et al.* [192] en el que estudian mediante SEC-ICP-MS la interacción de carboplatino con biomoléculas de peso molecular cercano al de las γ -globulinas y HSA. También cabe destacar el estudio realizado por Ni *et al.* [211], en el que concluyeron que la unión de carboplatino a HSA podría favorecer el efecto quimioterapéutico del fármaco, encontrando una mayor presencia y distribución del fármaco en diferentes órganos con respecto a un grupo control cuando éste es administrado conjuntamente con una disolución de HSA.

- **Interacciones en el interior celular:**

Una vez que los fármacos platinados atraviesan la membrana celular pueden unirse a diferentes biomoléculas, desde proteínas de membrana hasta componentes celulares citoplasmáticos. En cuanto a las **biomoléculas de membrana**, los fármacos de Pt se unen preferentemente a proteínas de membrana como los transportadores anteriormente comentados o la proteína OmpA [212]. Pero también, aunque en menor extensión, pueden unirse de forma electrostática a diversos fosfolípidos [213], lo cual resultará en cambios estructurales de la membrana que provocarán alteraciones en la fluidez y permeabilidad de ésta [74].

Con respecto a las biomoléculas presentes en el **citoplasma**, los fármacos platinados tienden a coordinarse principalmente con biomoléculas que contengan grupos tiol, como proteínas, péptidos, el oligopéptido glutatión (GSH) y las MTs. Algunas de las dianas proteicas descritas en la bibliografía para el cisplatino son la ubiquitina [198], las proteínas con dedos de Zn ("*zinc finger proteins*") [214], la superóxido dismutasa (SOD) [200], el citocromo C (CytC) [197], la mioglobina (Myo) [215] o la calmodulina (CaM) [216], interaccionando con todas ellas a través de sus residuos de His, Met y Cys principalmente. Como es de esperar, la coordinación del fármaco con estas proteínas resulta en la alteración (e incluso la inhibición) de la actividad biológica de las mismas.

Por otro lado, la interacción entre los fármacos platinados y las MTs o el GSH ha sido ampliamente estudiada, ya que estas interacciones conducen a la aparición de resistencias al tratamiento con estos fármacos, lo cual se explicará más adelante. En cuanto a las **MTs**, son una gran familia de proteínas de bajo peso molecular (6-7 kDa) con un elevado contenido en metales y un gran número de residuos de cisteína, involucradas en la homeostasis del Zn^{2+} y en la detoxificación celular de metales pesados como el cobre y el cadmio. El gran número de residuos de Cys que contienen les permite complejar altas estequiometrias de metales formando estructuras tipo *cluster* metal-tiolato. De hecho, en la bibliografía se ha descrito que las MTs son capaces de ligar cisplatino en una relación de proteína: fármaco 1:10 [217]. Esta elevada relación de coordinación sugiere la unión del cisplatino a otros residuos además de las Cys, lo cual fue demostrado por Palumaa *et al.*, quienes observaron enlaces del Pt con ligandos N y O dadores [218]. Algunos estudios realizados mediante SEC-ICP-MS han demostrado desplazamientos del Zn y el Cd tras la unión del cisplatino a las MTs [115,219]. Finalmente, el **GSH** es un tripéptido de Glu-Cys-Gly que actúa como antioxidante celular y que se encuentra en elevadas concentraciones en el citoplasma (del orden de mmoles L^{-1}). La interacción de GSH con cisplatino, carboplatino y oxaliplatino ha sido estudiada más ampliamente que la interacción con MTs, observándose una interacción con cisplatino más intensa que con los otros dos fármacos [220]. Se ha observado que la cinética de dichas reacciones son de primer orden para los tres fármacos, y que la velocidad de las etapas iniciales, similar entre cisplatino y oxaliplatino, es casi 5 veces menor para carboplatino.

La unión de los fármacos platinados a los bioligandos comentados anteriormente implica una gran reducción de la cantidad de fármaco disponible para interaccionar con el ADN, lo cual se traduce en una disminución de la citotoxicidad y en la aparición de resistencia a los tratamientos en ciertos tumores, tal y como se explicará a continuación.

1.5 Resistencia al tratamiento con fármacos antitumorales de Pt

En la naturaleza, la aparición de resistencia a los fármacos ocurre en todos los organismos vivos, desde las bacterias hasta células tumorales humanas. Esta resistencia es un mecanismo natural de autodefensa desarrollado durante la evolución para proteger las células de productos tóxicos u otros factores de estrés ambiental. Uno de los principales problemas que surgen en el tratamiento con la quimioterapia antineoplásica es la aparición de resistencia de los tumores al tratamiento [11,27,221,222]. Esta **resistencia** puede ser **intrínseca**, pero también puede ser **adquirida** debido a largas exposiciones al fármaco. Casi un 50% de los pacientes presentan tumores que son resistentes a cisplatino, estimándose que un 90% de las muertes por cáncer son debidas a la aparición de este fenómeno [223].

Debido al gran número de mecanismos de transporte y dianas farmacológicas de los fármacos con base de Pt, existen numerosas vías de aparición de la resistencia, las cuales han sido ampliamente estudiadas. En este punto, cabe destacar que según la base de datos de PubMed existen más de 8000 publicaciones relacionadas con la resistencia a los fármacos antitumorales con base de Pt [224].

A continuación, se describen brevemente algunas de las vías de aparición de resistencia a los tratamientos antitumorales con base de Pt, las cuales se resumen esquemáticamente en la **Figura 10**:

- **Disminución en la acumulación intracelular:** La acumulación de los fármacos con base de Pt en el interior celular está mediada por el transporte de entrada y salida de la célula a través de diferentes mecanismos, tal y como ha sido explicado en el apartado 1.4.1. Cuanto menor sea la concentración de los fármacos platinados en el interior celular, menor será la posibilidad de interacción con el ADN y, por tanto, su efecto citotóxico. Por tanto, la disminución en la acumulación en el interior celular es una de las vías por las que aparecen fenómenos de resistencia asociada al tratamiento con estos fármacos [11,115,221]. La disminución de la acumulación puede producirse de diferentes formas, bien por una disminución de la entrada de los fármacos a la célula, o por un aumento de su excreción al exterior celular. La disminución en la entrada puede darse por bloqueo de la endocitosis, pinocitosis, o de los

transportadores de membrana. En este punto, se ha reportado una disminución de más del 50% en la expresión de CTR1 en líneas celulares resistentes a cisplatino con respecto a células no resistentes [127,128,225,226]. Por otro lado, también ha sido observado por diferentes autores una sobreexpresión de las proteínas implicadas en la excreción de los fármacos, como las ATP7A/B, MRPs, o los transportadores MATE [141,142,227–229].

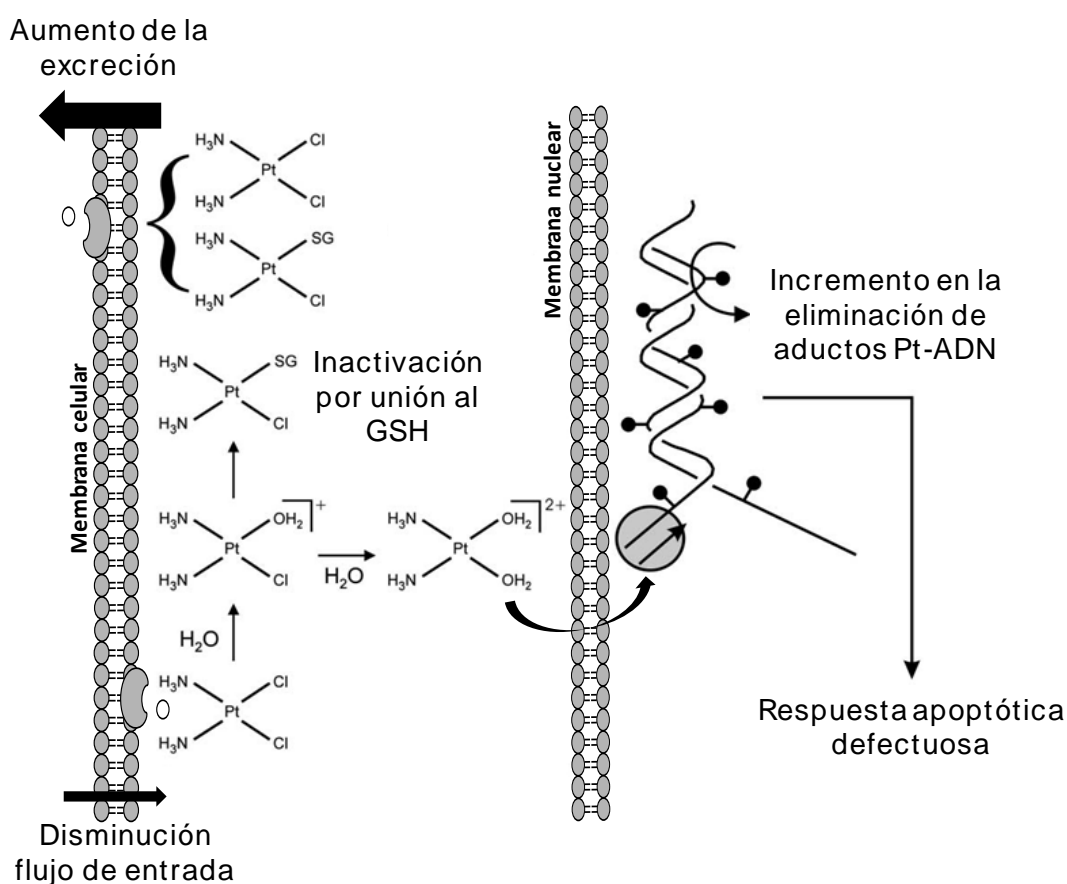


Figura 10. Principales mecanismos propuestos de resistencia celular al tratamiento con fármacos con base de Pt. Como ejemplo se muestra para la molécula de cisplatino. Adaptado de Kartalou et al. [221]

• **Desactivación del fármaco en el interior celular:** Como ha sido comentado en apartados anteriores, cuando los fármacos platinados entran al interior celular pueden interactuar con diversas biomoléculas además del ADN. Estas interacciones, que se producen fundamentalmente con biomoléculas con grupos tiol como el GSH, las MTs o la tiorredoxina (Trx), disminuyen la concentración de fármaco libre que puede interactuar con el ADN. En líneas celulares resistentes a cisplatino se ha observado

un claro aumento en los niveles de GSH [230–232], y viceversa, las células son más sensibles al fármaco cuando disminuye dicha concentración [233]. Además, la sobreexpresión de las Glutación-S-Transferasas parece estar relacionada con la resistencia a cisplatino de algunos tumores [234,235]. Algunos autores describen que el GSH también está relacionado con procesos de aparición de resistencia a carboplatino y otros fármacos polinucleares de Pt de nueva generación [236]. Por otro lado, a partir de ciertas evidencias preclínicas se ha postulado la posible relación entre la unión de los fármacos platinados con las MTs y la resistencia al tratamiento. En este punto, se han observado niveles de MTs en líneas celulares resistentes a cisplatino de hasta cinco veces superior a los niveles normales [237–240]. También se observó una mayor resistencia a cisplatino en líneas celulares transfectadas con estas proteínas [241]. Sin embargo, la relación entre los niveles de MTs y la resistencia a cisplatino podría ser específica para ciertos tejidos, pudiendo desempeñar un papel de menor importancia dependiendo del entorno celular, ya que por ejemplo, a diferencia de los tumores de cabeza y cuello, donde el cisplatino induce la sobreexpresión de MTs [242], en células germinales y tumores de testículo no se ha observado una relación entre el nivel de MTs y la resistencia al fármaco [243]. Finalmente, cabe comentar la existencia de una correlación entre el antioxidante Trx y la aparición de resistencia a cisplatino en tumores de vejiga, próstata, hígado, cáncer gástrico y de colon [244].

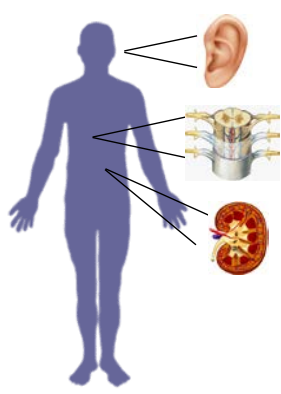
• **Alteración de los mecanismos de reparación del ADN:** Otro de los mecanismos que induce la resistencia al tratamiento con fármacos platinados es el aumento de la capacidad de las células para reparar los aductos Pt-ADN formados. Un aumento en el funcionamiento de las vías comentadas anteriormente en el apartado 1.4.3. (por sobreexpresión de las proteínas involucradas en ellas) limita el efecto citotóxico de estos fármacos e induce la resistencia. Como ejemplo, se ha reportado una sobreexpresión de los genes participantes en NER XPA y ERCC1-XPF en tumores de pacientes resistentes a cisplatino [245]. También se han encontrado niveles muy elevados de XPB en tumores de ovario primarios con respecto a muestras tumorales de pacientes que responden eficazmente al tratamiento [246]. Con respecto al oxaliplatino, se ha observado que el tratamiento con este fármaco induce la expresión de las proteínas XPA y ERCC1 [247]. Por otro lado, se ha observado que la inactivación

de genes implicados en el mecanismo MMR induce resistencia a cisplatino [248], así como la sobreexpresión de la polimerasa β implicada en el mecanismo de síntesis translesión [183].

• **Expresión reducida de las vías de señalización apoptótica:** La alteración de los genes o proteínas participantes en las cascadas de señalización apoptótica puede inducir la resistencia a estos fármacos. Como ejemplos, se han reportado mutaciones en el gen TP53 (codificador de la proteína p53 la cual induce la apoptosis), o sobreexpresiones del gen bcl-2 (supresor de la apoptosis) en líneas celulares resistentes a cisplatino [249–251].

1.6 Toxicidad debida al tratamiento con cisplatino: Nefrotoxicidad

Como ha sido comentado previamente, el tratamiento con fármacos antitumorales con base de Pt conlleva la aparición de diferentes efectos secundarios en función del tipo de fármaco administrado. Respecto al cisplatino, carboplatino y oxaliplatino, sus efectos secundarios más comunes se recogen en la **Figura 11**.



Efecto secundario	Cisplatino	Carboplatino	Oxaliplatino
Ototoxicidad	Adultos: 23-50% Niños: < 50%	1%	Poco frecuente
Neuropatía periférica	Adultos: 62% Niños: < 10%	Dosis convencional: 6% Alta dosis: 25%	Aguda: 95% Acumulativa: 15%
Nefrotoxicidad	20-41%	En pacientes con función renal irregular	Poco frecuente
Mielosupresión	< 5%	Dosis convencional: 20-40% Alta dosis: > 90%	Poco frecuente

Figura 11. Principales efectos tóxicos asociados al tratamiento con fármacos con base de Pt

Debido a la excreción de los fármacos platinados a través de la orina, su acumulación en el riñón es mucho mayor que en otros tejidos. Concretamente para el

cisplatino, su uso quimioterapéutico se ve obstaculizado por la aparición de una **nefrotoxicidad** que limita la dosis del fármaco que puede ser administrada [252]. En los primeros ensayos clínicos, ya se observó que la administración de dosis prácticamente atóxicas de cisplatino podía producir la muerte por nefropatía aguda [253]. Actualmente, a pesar de las medidas profilácticas de prevención aplicadas, que consisten en una hidratación intensiva previa del paciente y diuresis forzada, entre el 20 y el 40% de los pacientes sufre cierta nefrotoxicidad después de la administración de una sola dosis de cisplatino [254].

La toxicidad renal inducida por cisplatino puede manifestarse de diferentes formas, como un fallo renal agudo, hipomagnesemia, síndrome de Fanconi, acidosis del túbulo renal distal, hipocalcemia, pérdida de sales renales, hiperuricemia, proteinuria, deficiencia en eritropoyetina, microangiopatía trombótica, y fallo renal crónico [255]. De todas ellas, la más común es la aparición de un **fallo renal agudo**, el cual aparece en el 20-30% de los pacientes. Los síntomas padecidos por los pacientes, además de la pérdida de peso, son los propios de un fallo renal como la disminución de la tasa de filtración glomerular (GFR), un aumento de la creatinina (azotemia) y de la concentración de nitrógeno ureico en sangre (BUN), poliuria (producción de un alto volumen de orina, debido a la disminución en los canales de acuoporinas), proteinuria y glucosuria (niveles elevados de proteínas y glucosa, respectivamente, en la orina), niveles bajos de magnesio y potasio en sangre, y pérdida de sodio, potasio, magnesio y calcio a través de la orina [252,256]. La aparición de estos síntomas obliga a menudo a suspender el tratamiento, produciéndose en un 60% de los casos la interrupción del tratamiento en el tercer ciclo de los cuatro habituales para cisplatino.

Existen numerosos estudios sobre los mecanismos responsables de la resistencia inducida por cisplatino [255,256]. Generalmente, la aparición de la nefrotoxicidad ha sido asociada a la desproporcionada acumulación observada de cisplatino en el riñón [257]. Como se ha comentado en el apartado 1.4.1, dicha acumulación está mediada por los transportadores celulares Ctr1, OCT2 y MATE. De hecho, se ha demostrado que la variación en la expresión de dichos transportadores está directamente relacionada con la nefrotoxicidad producida. Más específicamente, se ha demostrado que el fallo renal producido es debido a la toxicidad inducida por la acumulación de cisplatino en las células epiteliales del túbulo proximal renal (*“Renal Proximal Tubule Epithelial*

Cells”, RPTECs) (**Figura 12**). Estas células epiteliales se sitúan como una monocapa en la superficie del túbulo proximal, lo que conduce a que sufran una exposición continua al fármaco. De hecho, la concentración de cisplatino encontrada en estas células es cinco veces superior a la concentración de cisplatino en el suero, lo que indica una acumulación activa del fármaco en estas células renales [258]. Recientes estudios de bioimagen realizados mediante ablación láser acoplada a espectrometría de masas elemental con plasma acoplado inductivamente (LA-ICP-MS) demuestran una mayor acumulación del cisplatino en la corteza renal, principalmente en el segmento S3 del túbulo renal, donde se localizan dichas células [259]. Sin embargo, el mecanismo por el cual el cisplatino lesiona selectivamente este tipo de células no proliferativas es todavía objeto de estudio [260].

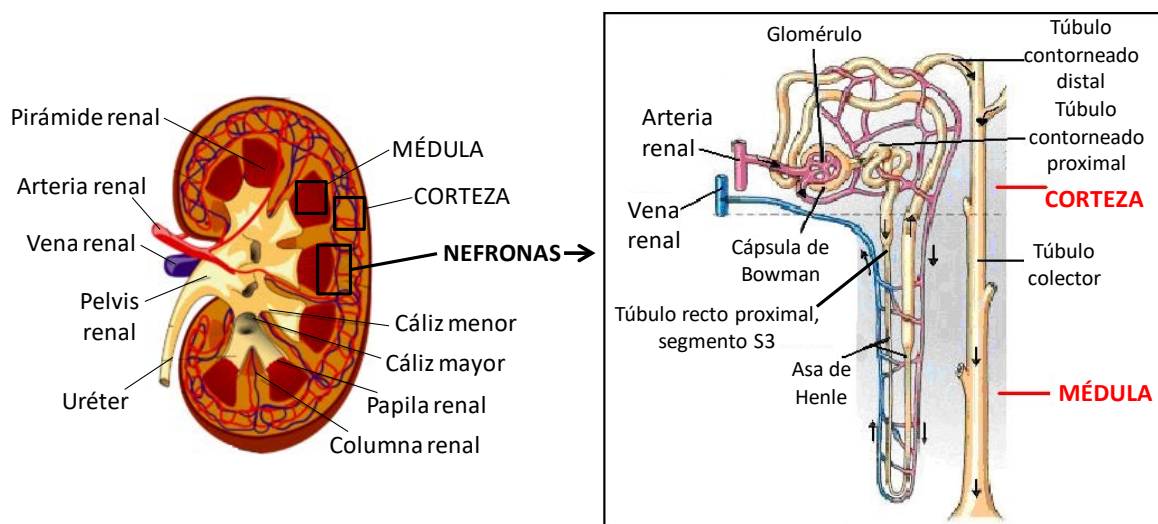


Figura 12. A la izquierda, corte sagital que muestra la estructura y morfología del riñón. En la derecha, descripción de las partes constituyentes de una nefrona renal

Con respecto a los demás fármacos, Esteban-Fernández *et al.* describen una acumulación de cisplatino y oxaliplatino en riñón similar (siendo incluso mayor para el oxaliplatino), y mucho mayor a la acumulación observada para carboplatino [261]. Sin embargo, sólo el tratamiento con cisplatino induce nefrotoxicidad en los pacientes, lo que apunta a que no sólo la acumulación de los fármacos en el tejido es la responsable de la nefrotoxicidad inducida, sino a qué tipo de biomoléculas se están uniendo dichos fármacos. Esto pone de manifiesto la necesidad de desarrollar estrategias analíticas que permitan identificar las **especies platinadas presentes en el riñón**, lo cual podría

ayudar a dilucidar los mecanismos involucrados en la nefrotoxicidad y ayudar al desarrollo de nuevas estrategias o fármacos nefroprotectores.

1.6.1 Estrategias nefroprotectoras

Debido al carácter limitante de la toxicidad renal, en los últimos años han sido evaluadas diversas estrategias con objeto de paliar la nefrotoxicidad inducida por cisplatino. Inicialmente se propuso la hidratación de los pacientes con disoluciones de NaCl o NH₄Cl horas antes de cada administración con el fin de facilitar la eliminación del fármaco en la orina [262,263]. Cabe destacar que, aunque muchos de los regímenes de hidratación incluyen el uso de los diuréticos manitol o furosemina, no se han encontrado evidencias de que dichos diuréticos produzcan algún beneficio [264–266]. De hecho, las recomendaciones clínicas publicadas recientemente recomiendan una hidratación previa con una disolución salina al 0,9%, y evitar el uso de diuréticos [267].

Tabla 2. Estrategias empleadas para la prevención de la nefrotoxicidad inducida por cisplatino

Reducción de la acumulación o activación renal de cisplatino	
Inhibidores de OCT2 (cimetidina o metformina); inhibidores de Ctr1 (Cu); administración de cisplatino micelar o liposomal; inhibidores de la γ -glutamyl transpeptidasa; inhibidores de glutatión-S-transferasa	[268–272]
Antioxidantes	
Vitaminas C y E, silibilina, curcumina, L-carnitina, compuestos de Se, biciclol, N-acetilcisteína, aminoguanidina, edavarona, extracto de cardo mariano	[273–278]
Bloqueantes de la vía apoptótica	
Inhibidores de p53; inhibidores HDAC; inhibidores de caspasas; inhibidores de CDK2	[279–286]
Prevención de los procesos inflamatorios	
Antagonistas de TNF- α y TLR4; inhibidores de p38 y JNK; salicilatos; fibratos	[287–291]

Por otro lado, numerosos compuestos de distinta naturaleza han sido estudiados como posibles nefroprotectores, aunque la mayoría de ellos no han superado los ensayos clínicos para su comercialización. En la **Tabla 2** se resumen las estrategias empleadas habitualmente, donde se incluyen algunos de los nefroprotectores empleados.

En base a lo expuesto hasta ahora se deduce que el empleo de cisplatino en las terapias antitumorales sigue siendo ineludible, siendo aplicado en aproximadamente el 50% de los tratamientos. Esto pone de manifiesto la necesidad de continuar con el estudio de sus mecanismos de acción y toxicidad a través del estudio de sus interacciones con diferentes biomoléculas. En el siguiente capítulo, se resumirán las principales metodologías analíticas disponibles para abordar dicho fin.

INTRODUCCIÓN

Capítulo 2. Metodologías analíticas en metalómica

Tal y como ha sido puesto de manifiesto en el capítulo 1, el estudio de las interacciones de los fármacos antitumorales de Pt con las diferentes biomoléculas del torrente sanguíneo o del citoplasma celular presenta un gran interés, ya que podría aportar información sobre los mecanismos de acción y la aparición de efectos secundarios no deseados. El estudio de estas interacciones requiere un trabajo multidisciplinar con colaboraciones entre diferentes áreas científicas como la Medicina, la Biología, la Bioquímica y la Química. Dentro del área de la Química Analítica, en las últimas décadas se han desarrollado nuevas metodologías y técnicas cada vez más sensibles, rápidas, versátiles y sencillas que han permitido realizar estudios de **especiación bioinorgánica**. El término especiación es definido por la IUPAC como la distribución de un elemento entre especies químicas definidas dentro de un sistema, y su análisis implica cualquier actividad analítica encaminada a identificar y/o medir la concentración de una o más especies químicas de la muestra. Por tanto, el estudio de las interacciones entre los fármacos platinados y diferentes biomoléculas se definiría como la especiación bioinorgánica del Pt.

Paralelamente, en el siglo XXI han surgido diferentes disciplinas “-ómicas” basadas en el análisis de las diversas clases de componentes de un organismo vivo en su conjunto. Así, surgieron la **genómica**, **proteómica**, y **metabolómica**, basadas en el

estudio del genoma (conjunto de genes de un organismo), proteoma (conjunto de proteínas expresadas a partir de la información contenida en un genoma en un lugar y unas circunstancias específicas), y metaboloma (conjunto de compuestos químicos que se encuentran en las células, producidos como resultados de reacciones espontáneas o catalizadas por enzimas), respectivamente. Con respecto a las interacciones entre biomoléculas y metales, Haraguchi y Matsura [292] propusieron el término “**metalómica**”, el cual hace referencia al análisis del metaloma, que consiste en el conjunto de especies existentes en un tejido o célula que se encuentran coordinadas a un metal [293,294]. En este punto también cabe definir el término **metaloproteoma**, que consiste en el conjunto de proteínas asociadas a compuestos metálicos. Existen diversas áreas de interés en metalómica, que van desde el estudio de las enzimas que requieren la unión a un metal para ejercer su actividad catalítica, el estudio de la relación entre la concentración de los metales en el medio ambiente y el genoma y proteoma de los seres vivos, la movilización de metales desde el suelo hacia las plantas y su distribución interna como posibles estrategias de fitorremediación de suelos, o la especiación de alimentos enriquecidos en un elemento esencial (como por ejemplo los fármacos enriquecidos en selenio), donde se estudian sus diferentes formas químicas, biodisponibilidad y transporte por el organismo. Sin embargo, en los últimos años ha surgido un gran interés por realizar estudios metalómicos en el área clínica, con objeto de obtener información sobre el metabolismo, transporte e interacciones con biomoléculas de diferentes fármacos metalados como los antiartríticos de Au, gástricos de Bi, compuestos de As para el Alzheimer o los fármacos antitumorales con base de Pt o Ru.

En el estudio de la interacción entre metales y proteínas en muestras biológicas, la determinación del contenido total de metales no suele ser un problema debido a la gran sensibilidad y especificidad que presentan las técnicas de análisis elemental como el ICP-MS. Sin embargo, la complejidad y heterogeneidad que presentan las muestras biológicas pueden acarrear ciertos inconvenientes. El análisis de especies ligadas a un metal en muestras biológicas presenta una serie de dificultades adicionales e importantes a tener en cuenta como son: i) la escasa concentración del metal; ii) las posibles biotransformaciones que pueden sufrir las especies durante el proceso de análisis, frecuentemente debido a un tratamiento de

muestra agresivo, al almacenamiento a temperaturas o tiempos elevados, o a la interacción con otras moléculas presentes en las diferentes etapas del proceso analítico; iii) la ruptura de la unión metal-biomolécula, que puede producirse tanto durante el tratamiento de muestra como en el análisis por las diferentes técnicas empleadas. Estas dificultades hacen de la **preparación de la muestra** una etapa fundamental en la que se tienen que tomar una serie de precauciones para conseguir resultados satisfactorios, y en la que el principal objetivo consistirá en **preservar la unión** entre el hetero-átomo y las biomoléculas, lo cual condicionará todos y cada una de las etapas tanto de la preparación de la muestra como del posterior análisis. A continuación, se describen las metodologías analíticas más relevantes empleadas para la identificación de proteínas coordinadas con Pt en muestras biológicas.

2.1 Preparación de la muestra para estudios metalómicos

El análisis de proteínas ligadas a metales en muestras biológicas requiere una cuidadosa manipulación de la muestra con el fin de asegurar que el complejo metal-proteína permanece en su estado nativo y que la unión del metal se conserva tanto durante el proceso de preparación como en el análisis de la muestra. Sin embargo, tradicionalmente los estudios de las interacciones entre fármacos y proteínas se han realizado empleando estrategias de preparación y análisis de la muestra que emplean metodologías y técnicas que fueron desarrolladas para su uso en proteómica clásica. Por ello, frecuentemente es necesario evaluar la estabilidad del enlace metal-proteína durante el proceso, siendo en muchas ocasiones necesaria una modificación de los protocolos, generalmente empleando condiciones o reactivos menos agresivos.

Los estudios metalómicos en el ámbito biológico requieren el empleo de animales como ratas, ratones o cerdos, que servirán como modelo para el estudio de enfermedades. Así, las muestras empleadas serán fluidos corporales (sangre, orina, saliva, etc) o tejidos de órganos relacionados con la patología estudiada. En el caso del empleo de tejidos frescos, el protocolo a seguir es la perfusión de los mismos con disolución salina (0.9% NaCl) en frío (4°C) para eliminar los restos sanguíneos previamente a su excisión, seguido de su congelación en nitrógeno líquido. Finalmente,

los tejidos deben ser almacenados a -80°C hasta su análisis para evitar su degradación. En los casos en los que se requiera una simplificación del modelo, es práctica habitual el empleo de cultivos celulares obtenidos a partir de células extraídas de los tejidos de interés, lo cual reducirá la complejidad del tejido completo. En el estudio de las interacciones entre los fármacos con base de Pt y biomoléculas en muestras biológicas, en ocasiones es necesario simplificar aún más los modelos, recurriendo a la incubación de las proteínas con fármacos de interés.

Seguidamente, los tres pasos fundamentales en la **preparación de la muestra** son la ruptura celular, la inactivación o eliminación de sustancias interferentes y finalmente la completa disolución de las proteínas. La **ruptura celular** puede realizarse mediante diferentes métodos: por lisis de las membranas celulares por ósmosis, detergentes, ciclos de congelación/descongelación, o lisis enzimática; con ultrasonidos; o por métodos mecánicos como licuadoras u homogeneizadores de tipo Potter-Elvehjem. Estos métodos pueden emplearse individualmente o en combinación. Tras la lisis celular, los **compuestos interferentes** como proteasas, sales, lípidos, ácidos nucleicos, polisacáridos, o proteínas muy abundantes deben ser eliminados. En el caso de las proteasas, éstas deben ser inactivadas para prevenir la degradación de proteínas. Esta inactivación suele realizarse mediante la adición de inhibidores de proteasas, aunque éstos pueden dar lugar a la modificación de algunas proteínas y, por tanto, a la aparición de artefactos. Por ello, otras estrategias consisten en el calentamiento hasta ebullición de la muestra en presencia de SDS o la inactivación de las proteasas mediante la acidificación del medio. Sin embargo, debe ser tenido en cuenta que la inactivación completa de las proteasas es complicado [295]. Una estrategia muy efectiva para minimizar el riesgo de la modificación de proteínas y eliminación de interferentes es la precipitación de proteínas con ácido tricloroacético (TCA) y acetona. Mediante esta estrategia se consigue preconcentrar las muestras, eliminar sales y polisacáridos, y desnaturalizar proteasas endógenas [296,297]. El análisis de muestras que contengan proteínas muy abundantes (como por ejemplo muestras de suero y plasma donde existe un alto porcentaje de albúmina, transferrina, inmunoglobulinas, etc.), éstas pueden dificultar la identificación de proteínas minoritarias, por lo que suelen emplearse diferentes estrategias para eliminar los

compuestos mayoritarios como por ejemplo la cromatografía de afinidad, o los *kits* comerciales de depleción.

Finalmente, las **proteínas deben solubilizarse** en un medio de extracción adecuado. Para facilitar dicha disolución, las proteínas deben ser desnaturalizadas y reducidas con el fin de romper las interacciones intra- e intermoleculares. La desnaturalización de las proteínas suele llevarse a cabo mediante agentes caotrópicos o detergentes. Los agentes caotrópicos como la urea, tiourea o hidrocloreto de guanidina rompen los puentes de hidrógeno y las interacciones hidrofílicas, desplegando las proteínas y haciendo accesibles sus residuos. En este punto, debe tenerse en cuenta que en presencia de urea debe evitarse el calentamiento de la disolución, ya que las altas temperaturas descomponen la urea en isocianato, que daría lugar a la aparición de heterogeneidades en la carga de las proteínas por carbamilación de las mismas. Por otra parte, los detergentes rompen las interacciones hidrofóbicas, facilitando la disolución de las proteínas. Los detergentes empleados habitualmente pueden ser compuestos iónicos (SDS), no iónicos (Tritón X-100) o zwitteriónicos (CHAPS). Además, suelen emplearse agentes reductores como el ditioneitol (DTT), ditioeritritol (DTE), la tributilfosfina (TBP), triscarboxietilfosfina (TCEP) o el β -mercaptoetanol (BME), que reducen los puentes disulfuro entre cisteínas facilitando la apertura de las proteínas.

Una vez disuelta la muestra, la **presencia de sales** puede interferir en los métodos posteriores de separación, digestión enzimática y análisis por espectrometría de masas (MS). En el caso de la MS, la presencia de sales frecuentemente resulta en la supresión de la ionización de los analitos. Por ello, las sales deben ser eliminadas previamente mediante diálisis, ultrafiltración, filtración en gel, precipitación de proteínas, o por extracción en fase sólida. La precipitación de proteínas con TCA y acetona, comentada anteriormente, proporciona un *pellet* proteico libre de sales que puede ser centrifugado y re-suspendido en el buffer adecuado. Sin embargo, mediante esta técnica pueden producirse pérdidas de los analitos de interés debido a una disolución incompleta de proteínas poco solubles. Por otro lado, la extracción en fase sólida permite de forma rápida y sencilla la eliminación de sales y otros interferentes. Este método se basa en la limpieza de la muestra a través de cartuchos con rellenos de fase inversa (generalmente resinas de C_{18}). Para bajos volúmenes de muestra, existen

cartuchos de escala micropreparativa como los ZipTip®, OMIX® o Gelloader®, que contienen los rellenos de C₁₈ en puntas de micropipeta. Estos formatos son de gran utilidad para la limpieza de muestras proteicas o peptídicas previamente a su análisis por MS molecular, ya que los analitos pueden ser eluidos en disoluciones compatibles con dichas técnicas.

2.1.1 Estrategias para la digestión de proteínas

Se ha demostrado que la **identificación de proteínas** a través de la secuenciación de los aminoácidos que componen su estructura resulta más precisa y menos compleja cuando se realiza mediante el análisis de los péptidos obtenidos tras la digestión de las mismas. La generación de dichos péptidos es una etapa crucial en los estudios proteómicos, y se lleva a cabo habitualmente mediante **digestiones proteolíticas selectivas**, es decir, mediante la escisión de enlaces específicos entre aminoácidos de la secuencia proteica. La **Tabla 3** muestra diferentes agentes proteolíticos empleados habitualmente en las digestiones proteicas. Éstos pueden ser diferentes agentes químicos o enzimas. La elección entre la digestión química o la enzimática dependerá de diversos factores como el tipo de proteína, su secuencia, o la finalidad del análisis. La principal ventaja de la digestión enzimática es el tamaño de los péptidos producidos, que es compatible con el análisis mediante MS. Las enzimas empleadas en el proceso de digestión se denominan proteasas, las cuales son enzimas hidrolíticas que actúan sobre los enlaces peptídicos en posiciones específicas. Cuando el objetivo del análisis es la identificación de proteínas, la enzima más empleada es la tripsina debido a que presenta las siguientes ventajas: i) escinde exclusivamente tras los residuos de lisina (Lys) y arginina (Arg) (excepto cuando van precedidos de prolina (Pro), los cuales corresponden a un 10-12% de los residuos, generando péptidos de masa comprendida entre 800 y 2000 Da, muy adecuados para su análisis por MS; y ii) los péptidos resultantes producen una fragmentación por colisión muy homogénea, por lo que el espectro de MS de sólo un péptido podría dar la suficiente información para identificar una proteína. Además, puesto que es la enzima más empleada, en los últimos años se han mejorado sus propiedades, aportando mayor eficiencia y resistencia a la autólisis.

Tabla 3. Agentes proteolíticos para la digestión de proteínas

	Agente proteolítico	Especificidad
Proteasas específicas	Tripsina	Arg-X, Lys-X
	Endoproteinasa Glu-C	Glu-X
	Endoproteinasa Arg-C	Arg-X
	Endoproteinasa Lys-C	Lys-X
	Endoproteinasa Asp-C	X-Asp
Proteasas no específicas	Quimotripsina	Phe-X, Tyr-X, Trp-X, Leu-X
	Termolisina	X-Phe, X-Leu, X-Ile, X-Met, X-Val, X-Ala
	Pepsina	Phe-X, Tyr-X, Trp-X, Leu-X, Met-X
	Elastasa	Amplia especificidad
Agentes químicos	Bromuro de cianógeno	Met-X
	N-clorosuccinimida	Trp-X
	N-bromosuccinimida	Trp-X

Existen diferentes formas de llevar a cabo la **digestión de proteínas** dependiendo del proceso de fraccionamiento empleado para la separación de las mismas. Si las proteínas han sido separadas mediante técnicas electroforéticas basadas en geles, se realizará una digestión en gel de las bandas que contengan las proteínas de interés. Por otro lado, si la separación se ha realizado mediante técnicas sin gel como las separaciones cromatográficas, o incluso si se desea digerir la muestra proteica en las etapas iniciales del análisis, se empleará el protocolo de digestión en disolución. Estas estrategias han sido ampliamente empleadas y optimizadas por la comunidad proteómica y están diseñadas para solubilizar las proteínas hidrofóbicas, producir digeridos trípticos, y eliminar el SDS [298]. A continuación se describen brevemente dichas estrategias y los avances desarrollados recientemente:

La técnica de **digestión “in-gel”** consiste en la digestión *in situ* de proteínas previamente separadas por técnicas electroforéticas en geles, es decir, la digestión se realiza en la propia matriz del gel [299]. Esta técnica surgió debida a la mayor facilidad de elución del gel de los péptidos en comparación con las proteínas intactas. De las técnicas de digestión existentes, ésta es sin duda la más larga y tediosa. Brevemente, el proceso consiste en el corte de las bandas que contengan las proteínas de interés,

destinción de las mismas (en función del proceso de tinción empleado), y digestión. Para conseguir una digestión eficaz, deben de tenerse en cuenta algunos aspectos importantes tales como: deshidratar los geles previamente a la digestión, para así favorecer la penetración en el gel de la disolución que contiene la proteasa; utilizar una relación enzima/sustrato adecuada (que será mayor que en las digestiones en disolución) para asegurar la accesibilidad de la proteasa a las proteínas atrapadas en el interior del gel; controlar que las condiciones de pH y temperatura sean adecuadas para la actividad de la proteasa. Esta técnica presenta algunos inconvenientes, como la inaccesibilidad de la proteasa a algunos de los enlaces peptídicos o la no elución desde el gel de algunos de los péptidos formados.

Por otro lado, la **digestión en disolución** puede realizarse tras separaciones cromatográficas de proteínas, o bien en los estudios “shotgun” donde la mezcla proteica es digerida al inicio del experimento [300]. Mediante el empleo de esta técnica la identificación de proteínas mayoritarias suele ser una tarea sencilla, mientras que la identificación de proteínas minoritarias suele requerir etapas adicionales de preconcentración y/o purificación. El rendimiento obtenido mediante este tipo de digestión puede variar dependiendo de la heterogeneidad de la matriz, de la cantidad de proteínas presente en la muestra, y de sus propiedades físico-químicas. Para favorecer el proceso de digestión (que dura entre 12 y 24h), el procedimiento que suele llevarse a cabo consiste en una previa precipitación de las proteínas, seguida de una resuspensión en tampón de bicarbonato amónico en condiciones desnaturizantes (urea 8M, para facilitar el acceso a los enlaces) y una reducción y alquilación de los puentes disulfuro (con DTT y iodoacetamida (IAA) respectivamente) para bloquear la renaturalización de las proteínas. Finalmente, la digestión se para mediante la adición de ácido trifluoroacético o fórmico hasta pH 2-3, pudiéndose analizar los péptidos obtenidos directamente mediante cromatografía líquida acoplada a espectrometría de masas en tándem con ionización por electrospray (LC-ESI-MS/MS). Finalmente, los péptidos son identificados por su espectro de fragmentación mediante el empleo de software especializados que comparan el perfil de fraccionamiento experimental con fraccionamientos generados *in silico* a partir de todas las proteínas existentes en una base de datos. Este procedimiento es conocido como “*Peptide-Fragment Fingerprinting*” (PFF) [301].

A pesar de ser las estrategias más empleadas en proteómica, las digestiones en gel y en disolución presentan una serie de inconvenientes, como son largos tiempos de digestión, bajas relaciones tripsina:sustrato (para evitar la producción de péptidos procedentes de la autólisis de la tripsina que pueden interferir en el proceso de identificación, lo cual conduce a bajos rendimientos de digestión), pueden producirse pérdidas por adsorción de péptidos, y un alto tiempo de realización y manipulación de muestra. Debido al elevado tiempo de manipulación y a los agentes desnaturizantes y reductores empleados (SDS, urea, DTT, etc), estas estrategias de digestión pueden suponer un riesgo en el estudio de proteínas ligadas no covalentemente a metales como es el caso de las proteínas ligadas a Pt. En esos casos, es necesario un estudio previo para evaluar la estabilidad de los complejos tras el proceso de digestión.

Recientemente, el grupo de Mattias Mann propuso una variante de la digestión tradicional en disolución, en la que se modifica el protocolo incluyendo el empleo de filtros de corte molecular [302]. Este método, denominado ***“fast assisted sample preparation” (FASP)*** consiste en una digestión en disolución de la mezcla proteica con pequeños volúmenes de disolvente sobre filtros de corte molecular comerciales. Al igual que en las técnicas de digestión anteriormente descritas, se emplean reactivos como SDS, urea, DTT y IAA para solubilizar, desnaturizar y reducir las proteínas. Sin embargo, a diferencia de los métodos anteriores, dichos reactivos son eliminados tras finalizar cada etapa del proceso hasta llegar a la etapa de digestión, minimizando el tiempo de contacto entre los reactivos y las proteínas. Como resultado, esta metodología proporciona una mezcla de péptidos limpia de sales y detergentes que pudieran interferir en el posterior análisis, no observándose diferencias en el rendimiento de digestión para diferentes clases de proteínas [302]. La principal ventaja de esta técnica frente a las digestiones en gel y en disolución es la posibilidad de realizar la digestión en un amplio abanico de condiciones. Además, mediante esta técnica se consiguen unos rendimientos de de digestión similares a los métodos de digestión tradicionales [303,304].

Debido a que la digestión de proteínas es la etapa limitante en la mayoría de los procedimientos proteómicos, los trabajos recientes están enfocados en la **aceleración del proceso de digestión**. Aunque las condiciones óptimas de digestión están bien establecidas para un gran número de proteasas y aplicaciones, se sabe que algunas

proteasas son activas en un amplio rango de condiciones [305,306]. Así, y teniendo en cuenta que un incremento de la **temperatura** aumenta la cinética de la reacción, se propuso la digestión de la muestra a temperaturas superiores a las óptimas establecidas para cada proteasa. En este punto, es especialmente útil el empleo de proteasas termoestables, que permiten aumentar la temperatura del proceso, y por tanto reducir el tiempo de digestión. Por ejemplo, el empleo de la enzima termoestable termolisina permitió realizar la digestión de mioglobina, albúmina de suero bovino (BSA), Cyt c, y ribonucleasa A a una temperatura de 65°C, completándose la digestión en 15 minutos [307]. Havlis *et al.* consiguieron mediante la metilación reductora de la tripsina disminuir su autólisis y desplazar su temperatura óptima de actividad a 50-60°C, lo que permitió realizar digestiones a mayores temperaturas y concentración de enzima, consiguiendo realizar digestiones en tiempos inferiores a una hora [308]. Otras alternativas propuestas en los últimos años para acelerar la cinética de las digestiones proteicas son el empleo de ultrasonidos y radiaciones de microondas o infrarrojo. López-Ferrer *et al.* describen un aumento en la cinética de digestión de diversas proteínas mediante el empleo de ultrasonidos de gran intensidad [309]. Se ha descrito que la digestión asistida con microondas de varias glicoproteínas durante 15 min a 45°C proporcionó un mayor número de péptidos identificados con respecto a las condiciones normales de incubación a 37°C durante 18 horas [310]. Por otro lado, la energía de infrarrojo ha sido propuesta recientemente como una posible alternativa para la aceleración de los procesos de digestión. Así, Wang *et al.* demostraron una mejora en la identificación de proteínas digeridas con tripsina y quimotripsina empleando radiación de infrarrojo con respecto a las condiciones convencionales [311,312]. Finalmente, también se ha demostrado que un aumento de la presión durante la digestión produce un efecto catalítico. Yang *et al.* describen que un incremento de la presión a 6 bares con una simple jeringa reduce a 30 minutos el tiempo de la digestión triptica, obteniéndose resultados similares (o incluso mejores) a los obtenidos en las condiciones normales de digestión a presión atmosférica durante 12-24 horas [313].

2.2 Aproximaciones proteómicas para la caracterización de metaloproteínas

Existen dos **aproximaciones proteómicas** para la separación y análisis de mezclas complejas de proteínas, denominadas “*bottom up*” y “*top down*” (Figura 13) [314].

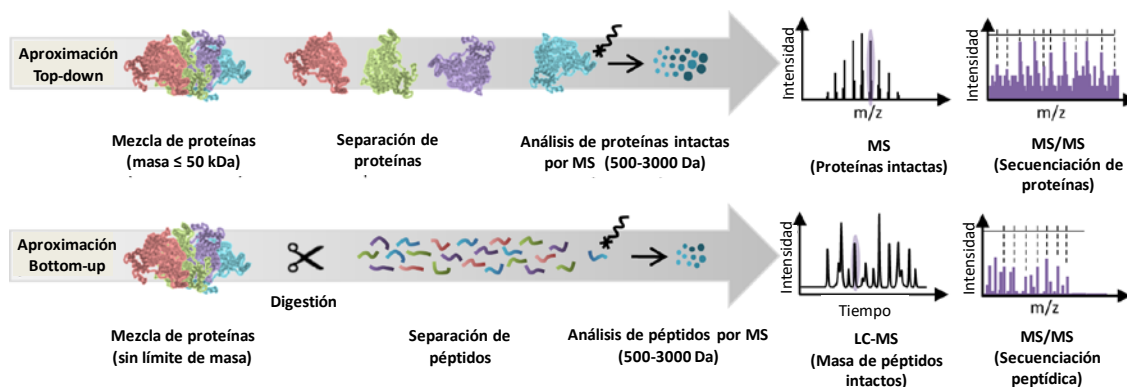


Figura 13. Aproximaciones proteómicas para la identificación de proteínas. Adaptado de Switzar et al. [298]

Actualmente, el procedimiento “**bottom up**” es el más empleado, el cual se basa en la identificación de proteínas mediante el análisis de los péptidos producidos tras la digestión enzimática- o química de la mezcla proteica, analizándose sus masas y secuencias posteriormente mediante LC-ESI-MS/MS o MALDI-TOF. Dentro de esta aproximación, existen dos vías experimentales diferentes. Por un lado, puede realizarse un fraccionamiento previo de las proteínas (generalmente por electroforesis bidimensional (2D-PAGE)), seguido de la digestión de las mismas en gel o en disolución. Finalmente, los péptidos obtenidos son analizados mediante técnicas de MS, a las cuales se puede acoplar una etapa previa de separación peptídica (generalmente nanoHPLC). Por otra parte, la segunda estrategia, denominada “*shotgun*”, consiste en la digestión de la muestra proteica sin realizar fraccionamientos previos, seguida de separaciones multidimensionales de alta resolución de la mezcla de péptidos generada, la cual es de gran complejidad, acopladas a la detección por técnicas de MS de gran sensibilidad. Una de las estrategias “*shotgun*” más recientes y frecuentemente empleada es el análisis mediante 2D-LC-ESI-MS/MS, conocida con el nombre de MudPIT (del inglés *multidimensional protein identification technology*) [315,316].

Por otro lado, la aproximación **“top-down”** está basada en el análisis de las proteínas íntegras mediante su ionización en fase gaseosa seguido de la medida de su masa exacta mediante un espectrómetro de masas de alta resolución. Las proteínas previamente purificadas son detectadas de forma íntegra, fragmentándose posteriormente mediante disociación por captura de electrones (ECD), disociación por transferencia de electrones (ETD), o por disociación activada por colisión (CAD). Estas estrategias de fragmentación directa de las proteínas permiten preservar cierta información que se pierde en otros procedimientos proteómicos, permitiendo caracterizar de forma más inequívoca isoformas de las proteínas así como sus posibles modificaciones postransduccionales. Por ello, la estrategia *top-down* presenta gran interés en el campo de la bioquímica clínica, ya que permite identificar proteínas modificadas como posibles biomarcadores de enfermedades [317]. Debido al mínimo tratamiento de muestra previo al análisis, esta aproximación presenta ventajas con respecto a la estrategia *“bottom-up”* en su aplicación al campo de la metaloproteómica, ya que disminuye las posibilidades de ruptura del enlace metal-proteína. Sin embargo, debido a limitaciones instrumentales y a la complejidad de los espectros de masas obtenidos (proporcional a la masa molecular de las proteínas), esta estrategia se limita al análisis de proteínas pequeñas en muestras muy sencillas o las cuales han sido simplificadas previamente.

2.3 Técnicas de separación

Como se ha comentado anteriormente, debido a la gran complejidad y la baja concentración de metales que presentan las muestras biológicas, es necesario realizar diversas **etapas de separación** previas al análisis que permitan aislar y preconcentrar las proteínas ligadas a metales del resto de proteínas, facilitando así la posterior identificación de las mismas.

En cuanto a la separación o fraccionamiento de proteínas en muestras biológicas, suelen realizarse separaciones (en numerosas ocasiones multidimensionales) empleando técnicas electroforéticas y cromatográficas las cuales serán acopladas posteriormente a las técnicas de detección elementales y/o

moleculares. A continuación, se resumirán brevemente las técnicas de fraccionamiento más empleadas para la separación de proteínas.

2.3.1 Técnicas de separación electroforéticas

Actualmente, la **separación bidimensional por electroforesis en geles de poliacrilamida (2D-PAGE)** es una de las principales estrategias de separación empleadas en los análisis proteómicos debido a su elevada resolución, ya que permite separar miles de proteínas en un solo análisis [318,319]. Se basa en la combinación de dos separaciones electroforéticas ortogonales en gel: una electroforesis por isoelectroenfoque (IEF), seguida de la electroforesis con geles de poliacrilamida en presencia de dodecilsulfato sódico (SDS) (**SDS-PAGE**) (**Figura 14**). Ambas técnicas fueron desarrolladas en 1975, empleándose desde entonces en la mayoría de los estudios proteómicos [320,321]. Para conseguir una separación óptima, cada dimensión debe separar las proteínas de acuerdo a diferentes parámetros. En el caso de la combinación de SDS-PAGE con IEF, estas técnicas proporcionan información de dos características fundamentales de las proteínas: el peso molecular y el punto isoelectro (pI), respectivamente. La combinación de ambas técnicas permite la separación del contenido proteico de cualquier muestra a través del gel en unos 1000-2500 *spots* que corresponden a unas 300-1000 proteínas, pudiéndose llegar en determinadas condiciones a obtener unos 10000 *spots* correspondientes a más de 3000 proteínas. Además, cabe destacar que a pesar de los avances obtenidos con otras metodologías proteómicas tales como el acoplamiento de la cromatografía de líquidos con espectrometría de masas (LC-MS/MS) o estrategias de marcaje como ICAT o iTRAQ, la separación por 2D-PAGE sigue siendo la metodología fundamental y más extendida dentro de las técnicas proteómicas disponibles habitualmente [322].

La técnica de **SDS-PAGE** separa las proteínas en función de su peso molecular a través de un gel de poliacrilamida colocado verticalmente entre dos soportes de cristal y colocado en una cubeta electrolítica donde se le aplica un campo eléctrico (**Figura 15**). Previo a la separación, es necesario realizar un tratamiento de muestra con el fin de desnaturalizar las proteínas y dotarlas de una relación carga/masa uniforme. Esto se consigue mediante la reducción de los puentes disulfuro con agentes reductores

como el ditioneol DTT o el BME, seguido de la adición de un detergente aniónico como el SDS que desnatura las proteínas y les proporciona una carga negativa proporcional a su masa. Así, las proteínas quedan en su forma abierta, sin plegamientos, y con una relación carga/masa similar. Finalmente, mediante la aplicación del campo eléctrico, las proteínas migran a través del gel de poliacrilamida con una velocidad inversamente proporcional a su tamaño, ya que las proteínas más grandes presentan mayor resistencia a la migración a través del entrecruzamiento del gel. En este punto, cabe destacar que el entrecruzamiento del gel puede ser modificado en función de la separación requerida. Como resultado se obtiene una separación muy reproducible, que puede ser calibrada mediante patrones proteicos de diferentes pesos moleculares. Finalmente las proteínas son fijadas en el gel, y reveladas con diferentes reactivos de tinción como el azul de Coomassie (Límite de detección (LD): 20-50 ng), la plata coloidal (LD: 1 ng), o reactivos fluorescentes como el Spyro Ruby (LD: 0.5 ng), Deep Purple (LD: 125 pg), Krypton (LD: 125 pg), o el Flamingo Red (LD: 30 pg).

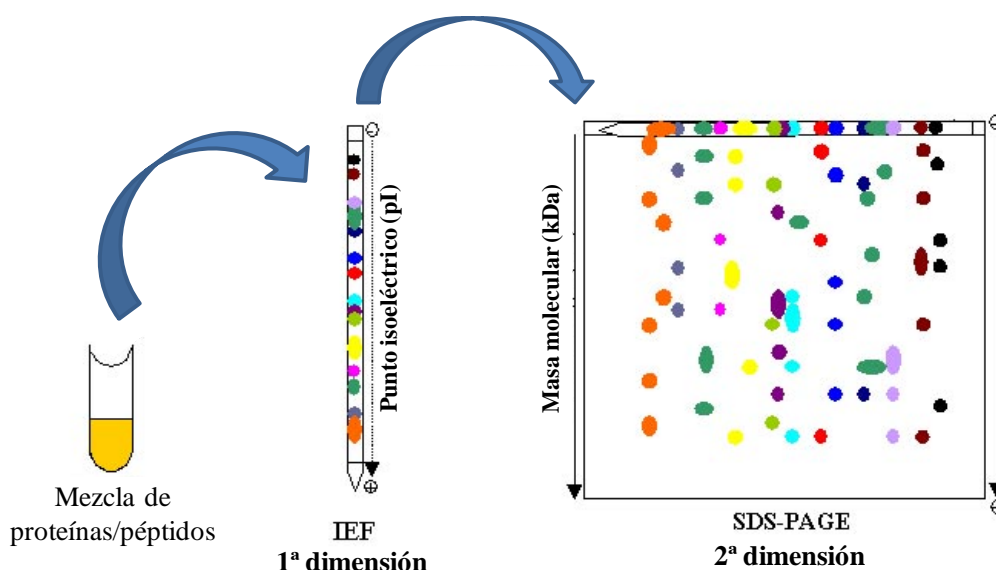


Figura 14. Esquema de la metodología 2D-PAGE

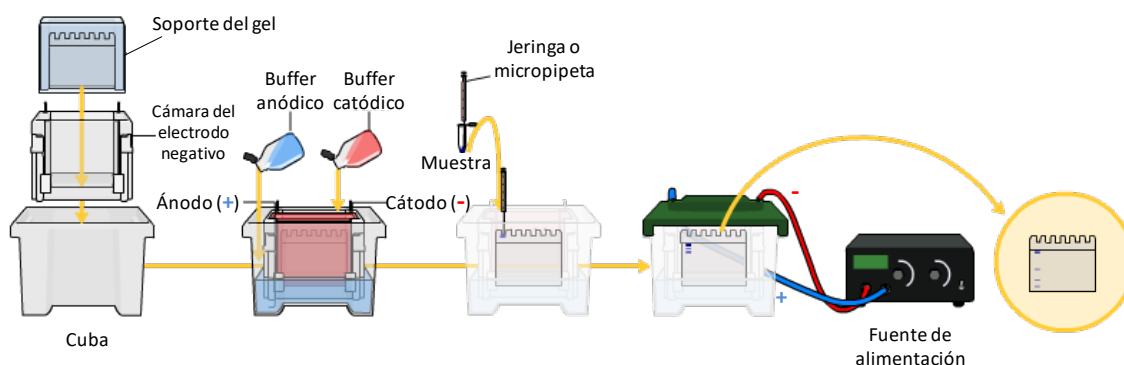


Figura 15. Esquema del procedimiento electroforético SDS-PAGE (Bio-Rad Laboratories)

A pesar de la alta resolución que ofrece esta técnica electroforética, en ocasiones dicha resolución no es suficiente para resolver la elevada cantidad de proteínas presentes en muestras complejas como las muestras biológicas. Es por ello que en numerosas ocasiones deban realizarse separaciones ortogonales, siendo la técnica de IEF la dimensión electroforética complementaria preferida. El fundamento de la separación por **isoelectroenfoque** está basado en la separación de proteínas según su pI. Debido a la naturaleza anfotérica de las proteínas, cuando éstas se encuentran sometidas a un campo eléctrico en un gradiente de pH migrarán por la tira de gel hasta llegar al punto donde el pH coincida con su pI, quedando así con carga neta cero y, por tanto, inmovilizadas en esa región de pH. El gradiente continuo de pH necesario durante la separación se generaba inicialmente mediante el empleo de anfólitos portadores [323]. Sin embargo, la introducción de tiras de gel con gradiente de pH inmovilizado (tiras IPG) supuso un gran avance, ya que resultó en un incremento de la reproducibilidad obtenida, por lo que el empleo de este tipo de tiras de gel se convirtió rápidamente en el método de referencia para la 2D-PAGE [324,325]. La obtención de estos gradientes inmovilizados se consigue mediante el empleo de una serie de derivados acrílicos (inmobilinas), que contienen grupos tamponantes en sus cadenas laterales. Haciendo co-polimerizar estos derivados junto con la poliacrilamida se consiguen geles con zonas de diferentes valores de pH, que vendrán dadas por la mezcla de especies tamponantes presentes en esa posición. Comercialmente se dispone de tiras IPG deshidratadas, con rangos variables de pH y resolución, con gradientes lineales y no lineales.

A pesar del potencial comentado anteriormente que presentan las técnicas SDS-PAGE e IEF para la separación de proteínas, también han sido descritos en la bibliografía algunos inconvenientes relacionados con la automatización, sensibilidad y el rendimiento ofrecido por estas técnicas [326]. Es por ello que en los últimos años se han desarrollado metodologías de separación “gel free”, las cuales sustituyen las técnicas de IEF convencionales con gel por otras metodologías sin utilización de gel, que permiten un acoplamiento más sencillo y preciso tanto a posteriores dimensiones de separación (electroforéticas o cromatográficas) como a las técnicas de análisis por MS. Así, recientemente se ha desarrollado una nueva metodología de fraccionamiento por isoelectroenfoque OFFGEL® (IEF en disolución) que permite la recuperación en fracciones líquidas (100-150 µL por fracción) de las proteínas o péptidos separados en una tira IPG previamente rehidratada [327–329]. Esta recuperación en fase líquida no sólo facilita el posterior acoplamiento con otras técnicas, sino que abre un amplio abanico de aplicaciones tanto para la cuantificación sin marcaje como por ICAT y iTRAQ. El primer instrumento multi-compartmentalizado desarrollado para la aplicación de esta técnica fue desarrollado en 2006 por Agilent Technologies, y comercializado bajo el nombre de 3100 OFFGEL-IEF Fractionator®. En este equipo se colocan las tiras IPG sobre un soporte bajo unos marcos de 12 o 24 pocillos (separación de baja y alta resolución, respectivamente) dispuestos sobre las tiras. Tras la rehidratación de la tira IPG, dichos pocillos permanecerán prácticamente estancos. Una vez disuelta la muestra en el buffer (el cual habitualmente contiene una mezcla de urea, tiourea, DTT, anfolitos y glicerol) y cargada en los pocillos, las proteínas migrarán por efecto del campo eléctrico a través del gel hasta situarse en el pocillo en el que el pH sea lo más cercano a su pI (**Figura 16**). Hörth *et al.* fueron los primeros en publicar una aplicación de este instrumento, mediante el cual realizaron una separación de péptidos en el rango de pI de 5 a 8 para digeridos proteicos de *Escherichia coli* [330,331]. Ésta técnica permite fraccionar la muestra tanto a nivel de proteínas [329,331–333] como a nivel de péptidos [328,334,335]. La separación electroforética a nivel de péptidos presenta una serie de ventajas como la minimización de las interacciones entre proteínas, la alta solubilidad que presentan los péptidos frente a las proteínas en numerosos disolventes, y la posibilidad de análisis de proteínas pequeñas e hidrofóbicas, siendo el principal inconveniente el elevado número de

péptidos obtenidos, los cuales tienen que ser posteriormente identificados. Sin embargo, en ocasiones la elección de un tipo de separación u otra es ambigua. Recientemente, Magdeldin *et al.* demostraron que empleando una misma carga inicial de proteínas/péptidos el fraccionamiento mediante OFFGEL a nivel de proteínas presenta una mejor identificación de proteínas, así como una mayor eficiencia de fraccionamiento y mejor resolución, mientras que la separación a nivel de péptidos resulta en mayores recuperaciones, número de péptidos identificados y mayores coberturas de la estructura de las proteínas [336].

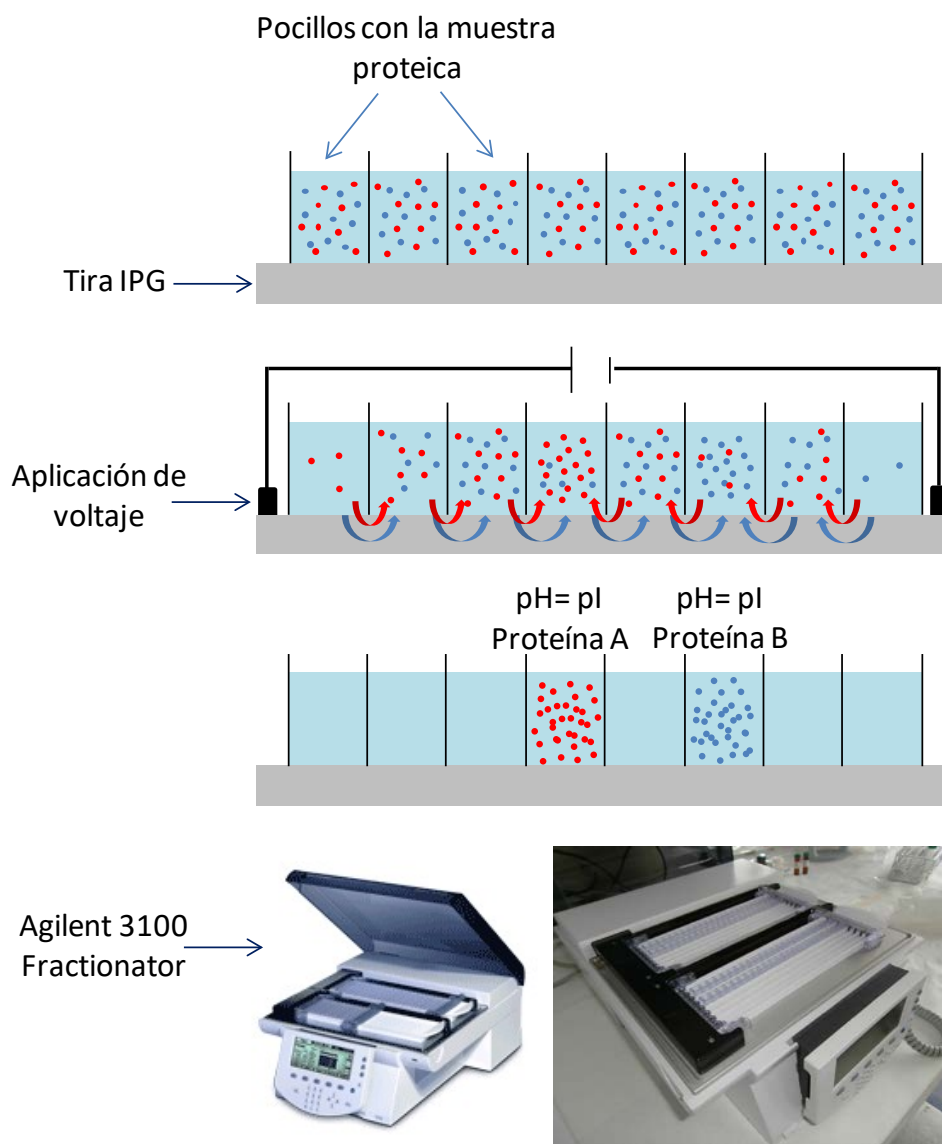


Figura 16. Esquema de la separación electroforética mediante el 3100 OFFGEL Fractionator (Agilent Technologies)

Una de las principales ventajas de la metodología 2D-PAGE reside en la posibilidad de ser aplicada a cualquier tipo de muestra, desde organismos procariotas como bacterias, parásitos u hongos hasta células eucariotas, orgánulos, tejidos, y fluidos biológicos. Sin embargo, cabe destacar que la separación mediante 2D-PAGE, la cual fue diseñada inicialmente para su aplicación en la proteómica clásica, no tiene en cuenta las posibles interacciones con metales de las proteínas estudiadas. Por tanto, para la aplicación de la separación 2D-PAGE en metalómica, es necesario realizar estudios previos que confirmen la estabilidad del enlace metal-proteína en las condiciones empleadas para la separación. En el caso de que las proteínas contengan algún hetero-átomo ligado covalentemente (como Se o P), la fortaleza del enlace permite que puedan realizarse las separaciones en las condiciones habituales [337,338]. Sin embargo, cuando existen aductos con enlaces lábiles no covalentes (como es el caso de los aductos Pt-proteína), evaluar la estabilidad del enlace durante el proceso es de suma importancia. Las condiciones desnaturalizantes, la corriente eléctrica o incluso los procesos de fijación, tinción y destinción del gel podrían afectar y romper los enlaces. Es por ello que en ocasiones es necesario realizar una electroforesis “nativa”, la cual se desarrolla en condiciones no desnaturalizantes y no reductoras (nr-SDS-PAGE), o se evita la tinción de los geles [339]. Concretamente en el caso de proteínas ligadas a Pt, se debe tener especial cuidado en las metodologías cuyas condiciones empleen reactivos con grupos tiol. Este es el caso de los reactivos reductores empleados en la 2D-PAGE como la tiourea, el DTT y el β -mercaptoetanol (BME), ya que debido a la alta reactividad del Pt hacia las moléculas S-dadoras y a la estabilidad de la formación de complejos Pt (II)-S, estos agentes reductores pueden competir con las proteínas por el Pt. En este punto, la estabilidad de los enlaces Pt-proteína en presencia de DTT y BME ha sido estudiada por diversos autores. Moreno-Gordaliza *et al.* demostraron que los enlaces Pt-proteína de un modelo de insulina incubada con cisplatino eran capaces de resistir la presencia de DTT 10 mM en tampón Tris [340]. Sin embargo, Khalaila *et al.* observaron mayores señales de Pt tras el análisis de un gel procedente de la separación de proteínas plasmáticas incubadas con cisplatino mediante SDS-PAGE nativa con respecto a las intensidades obtenidas tras la separación en condiciones reductoras [341]. Así, a pesar de la menor resolución y reproducibilidad conseguida con la nr-SDS-PAGE, esta estrategia ha sido propuesta

como una posible alternativa para la separación de complejos Pt-proteína en muestras biológicas, consiguiéndose resultados satisfactorios [212,342].

2.3.2 Técnicas de separación cromatográficas

La **cromatografía líquida de alta eficacia (HPLC)** permite fraccionar proteínas o péptidos en función de diferentes propiedades físicas y/o químicas empleando diferentes modos cromatográficos: exclusión molecular (SEC), intercambio iónico (IEC), interacciones hidrofílicas o hidrofóbicas, afinidad (AFC) y la más empleada de todas, fase inversa (RPLC). El hecho de que estas técnicas puedan ser acopladas directamente a las técnicas de detección o identificación por MS las confiere una ventaja con respecto a las técnicas de separación electroforéticas basadas en geles bidimensionales, debido a la mayor rapidez del proceso. Además, la separación de algunas proteínas que no suelen resolverse en estudios 2D-PAGE (como proteínas con pl o pesos moleculares muy extremos, proteínas minoritarias o proteínas de membrana), pueden ser separadas mediante separaciones cromatográficas bidimensionales. Sin embargo, como desventaja cabe destacar el hecho de que para obtener información cuantitativa se requiere una alta reproducibilidad en los tiempos de retención, lo cual sólo es posible mediante el empleo de cromatografía de muy alta presión (del inglés "*Ultra-High Pressure Liquid Chromatography*" (UPLC)). A continuación se describen brevemente las técnicas cromatográficas más empleadas en el análisis de especiación bioinorgánica.

La **cromatografía de fase inversa (RPLC)** es la cromatografía más empleada en la separación de proteínas y péptidos en aplicaciones proteómicas. Esta técnica separa los analitos en función de la hidrofobicidad de los mismos, los cuales interaccionan con la fase estacionaria, que consiste en partículas de sílice que tienen unidas covalentemente cadenas de hidrocarburos de longitud variable (C_4 - C_{18}). La principal ventaja de esta técnica reside en su altísima resolución (especialmente cuando se trabaja en gradiente), lo cual permite obtener buenas separaciones incluso en mezclas peptídicas complejas. Además, es muy adecuada para la concentración y desalado de péptidos. Sin embargo, su uso para la separación de proteínas es más problemático debido a la fuerte interacción de éstas con la fase estacionaria, por lo que se requieren

fases móviles muy agresivas. En este último caso, es recomendable el empleo de columnas con fase estacionaria polimérica, que permiten trabajar en un amplio rango de pH (2-11). La complementariedad de esta cromatografía con otras que se describen a continuación (principalmente SEC e IEC) la hace idónea para separaciones multidimensionales. Además, debido al tipo de eluyentes empleados habitualmente (acetonitrilo y metanol, o isopropanol en el caso de separación de proteínas) y la posibilidad de realizarse en versión capilar (μ -RPLC o n -RPLC), permite ser acoplada con facilidad a técnicas de MS moleculares como ESI-MS. Este tipo de cromatografía también puede ser acoplada a ICP-MS empleando diámetros normales de columna, pero en este caso se ha de utilizar el sistema de introducción de muestra con elevado contenido en disolventes orgánicos, el cual consiste en conos de Pt, sistema Peltier de enfriamiento de la cámara de spray (entre -7°C y -11°C), e introducción continua de una pequeña corriente de oxígeno en la antorcha, con objeto de minimizar la formación de negro de carbono en el inyector de la antorcha, el deterioro de los conos e incluso la extinción del plasma.

La **cromatografía por exclusión de tamaños (SEC)** consiste en la separación de los analitos en función de su tamaño (peso molecular y forma), de manera que las proteínas sean retenidas en la fase estacionaria de forma directamente proporcional a su tamaño. Esta técnica presenta gran utilidad en la separación de macromoléculas. Sin embargo las proteínas de bajo peso molecular pueden sufrir efectos secundarios de retención como intercambio iónico o adsorción. La cromatografía SEC presenta una serie de ventajas como una alta tolerancia a muestras biológicas con matrices complejas, caudales y fases móviles adecuados para su acoplamiento con técnicas de MS, y la posibilidad de simplificar la matriz de la muestra mediante la eliminación de contaminantes de alto o bajo peso molecular. Sin embargo, debido a su baja resolución y la baja pureza de los picos cromatográficos obtenidos, suele ser necesario emplear otras técnicas cromatográficas adicionales para el fraccionamiento de muestras de elevada complejidad. En este caso, la cromatografía SEC es elegida habitualmente como primera dimensión [343].

El fundamento de la **cromatografía de intercambio iónico (IEC)** se basa en la separación de los analitos en función de su carga eléctrica, quedando retenidos por interacción con moléculas cargadas unidas covalentemente a la fase estacionaria. Los

principales parámetros de la separación son el pH y la fuerza iónica, lo que requiere en ocasiones trabajar en condiciones muy ácidas, básicas o salinas, lo cual puede suponer un inconveniente tanto en el acoplamiento con ICP-MS como en la estabilidad de los enlaces metal-proteína. Sin embargo, este tipo de cromatografía presenta varias ventajas como una alta resolución, capacidad de separación de muestras complejas, y alta aplicabilidad a proteínas y péptidos. Mediante este tipo de cromatografía han sido separadas con éxito diferentes metaloproteínas [344,345].

La **cromatografía líquida de interacción hidrofílica (HILIC)** es una variante de la cromatografía de fase normal la cual se basa en la separación de los analitos en función de su diferente polaridad [346]. Se rige por la interacción hidrofílica que se produce entre los analitos y la fase estacionaria polar de la columna, por lo que el tiempo de retención del analito irá en función de la fortaleza de dicha interacción. Este tipo de cromatografía permite separar compuestos muy polares e hidrofílicos que no pueden ser separados correctamente mediante RPLC. El orden de elución en este tipo de cromatografía es prácticamente inverso al obtenido en fase inversa. Al igual que la RPLC, el eluyente empleado habitualmente en esta técnica (5-40% de H₂O en acetonitrilo (AcN)) permite su fácil acoplamiento con técnicas de identificación tipo ESI-MS [347]. Este tipo de cromatografía ha sido aplicada con éxito en el campo de la proteómica para la separación de mezclas peptídicas complejas, mostrándose apropiada para separaciones multidimensionales en aplicaciones proteómicas [348]. Con respecto a la metalómica, la cromatografía HILIC presenta gran interés para la separación de diferentes metabolitos ligados a metales, debido al carácter polar e hidrofílico de éstos [349].

La **cromatografía de afinidad (AC)** se basa en interacciones bio-específicas del analito de interés con los ligandos inmovilizados en el soporte cromatográfico. Debido a esto, esta técnica presenta una altísima especificidad, lo cual la convierte en una técnica muy útil para la purificación de proteínas o péptidos, proporcionando porcentajes de purificación de proteínas superiores al 95% en una sola etapa. Recientemente, Martinčič *et al.* han desarrollado una nueva metodología basada en la utilización de discos monolíticos de cromatografía AC e IEC conjunta para la separación de proteínas de suero humano ligadas a fármacos antitumorales con base de Ru y Pt, mediante la que lograron discernir entre Pt y Ru libre del ligado a Tf y HSA [350,351].

2.4 Espectrometría de masas elemental

El **ICP-MS** como fuente de ionización es una de las técnicas analíticas más importantes hoy en día para la determinación de concentraciones totales elementales, análisis isotópico, y para el análisis de especiación de compuestos tanto inorgánicos como orgánicos debido a su altísima sensibilidad, capacidad multielemental y multiisotópica, bajos límites de detección (ng L^{-1}) y amplio rango dinámico (10^9). Desde que se publicara por primera vez su aplicación en 1980 hasta hoy en día, ha sufrido un gran desarrollo que ha convertido a esta técnica en una de las más versátiles y poderosas para la determinación de elementos a nivel traza y ultratrazas en muestras biológicas [352–355]. Las características que presenta esta técnica la convierten en la principal opción para estudios de especiación bioinorgánica, desplazando a otras técnicas empleadas anteriormente como la espectroscopia de emisión atómica con fuente ICP (ICP-AES) o la fluorescencia de rayos X (XRF). Además, como se verá en el apartado 2.6, su fácil acoplamiento a las técnicas de separación cromatográficas la hace fundamental en estudios proteómicos y metalómicos [356]. A continuación se describe brevemente el fundamento de la técnica.

En ICP-MS con nebulización directa, las muestras líquidas pueden ser analizadas directamente, mientras que las muestras sólidas requieren una mineralización previa con el fin de poner en disolución los analitos y eliminar la matriz orgánica. Alternativamente, las muestras sólidas pueden ser medidas directamente mediante su acoplamiento a la ablación láser, como se desarrollará más adelante en este apartado. En el modo de nebulización directa existen diversas formas de introducir la muestra, pero todas ellas consisten en la aspiración y generación de un aerosol fino que puede ser fácilmente ionizable en el plasma. Habitualmente, la muestra líquida es nebulizada por un nebulizador neumático, como los nebulizadores Meinhard o MicroMist, nebulizadores ultrasónicos, o nebulizadores concéntricos con desolvatación (Aridus o APEX).

Posteriormente, la excitación e ionización de todos los elementos contenidos en el aerosol tiene lugar en el plasma, el cual consiste en un gas (generalmente Ar) altamente ionizado y conductor de la electricidad, generado en una antorcha de cuarzo por acción de una bobina de radiofrecuencias, donde se alcanzan temperaturas

entre 6000 y 8000 K. En este punto, la muestra es completamente disociada e ionizada, independientemente de su estructura original, lo cual implica que cualquier información estructural se pierde durante el proceso. Sin embargo, puesto que la ionización y atomización se dan de forma independiente (ya que tienen lugar en diferentes regiones y a diferentes tiempos), la influencia de la matriz en el proceso de ionización puede despreciarse, por lo que los calibrados serán independientes de la matriz. Esta es una de las principales ventajas de la técnica, ya que permite realizar calibraciones con fines cuantitativos con estándares elementales simples (la mayoría en disolución). Por tanto, mediante ICP-MS, la calibración es sencilla y exacta. Los iones generados en el plasma son transportados al analizador de masas a través de una interfase formada por un sistema de conos y lentes iónicas. El gradiente de presión existente entre la antorcha (a presión atmosférica) y la parte posterior de los conos ($10^{-3} - 10^{-4}$ bar) extrae los iones hacia una serie de lentes iónicas, donde los iones son focalizados hacia el analizador de masas. Finalmente, el analizador de masas a alto vacío ($10^{-8} - 10^{-9}$ bar) separa los iones de acuerdo a su relación masa/carga, los cuales son detectados en un detector, que suele consistir en un multiplicador de iones secundarios. El analizador más comúnmente empleado en los equipos de ICP-MS es el de tipo cuadrupolo (Q), que proporciona una resolución de $m/\Delta m$ 400. Sin embargo, existen otros analizadores como el de doble sector ("*Sector Field*", SF) que proporciona una resolución de hasta $m/\Delta m$ 10000; o el analizador de tiempo de vuelo ("*time-of-flight*", TOF), el cual se emplea cuando los espectros de masas tienen que ser registrados a intervalos de tiempo muy cortos, del orden de los milisegundos o incluso menores [357]. En la **Figura 17** se muestra esquemáticamente el equipo de ICP-MS, así como los diferentes tipos de analizadores.

Algunas de las desventajas de esta técnica son la presencia de interferencias espectrales, la incompatibilidad con algunas fases móviles empleadas en las separaciones cromatográficas, y el alto coste del instrumento y su mantenimiento. Las interferencias isobáricas y poliatómicas son una de las mayores limitaciones de esta técnica, ya que existen para un elevado número de isótopos. Las interferencias espectrales aparecen siempre que otros iones o grupos poliatómicos tengan una masa que difiera en menos de 0.5 amu con respecto al analito de interés. En estos casos, se requiere el empleo de analizadores SF, cuya elevada resolución permite en muchos

casos discernir entre las masas del analito y la interferencia, o el empleo de celdas de colisión o reacción que minimizan las interferencias poliatómicas [358].

La técnica de ICP-MS es la única técnica comercial que permite medir Pt en muestras biológicas debido a la baja concentración de dicho metal en las mismas. Mediante esta técnica ha sido posible determinar ultratrazas de Pt en sangre, orina, plasma sanguíneo, suero, ADN y tejidos biológicos con un LD de ng Pt L^{-1} [359].

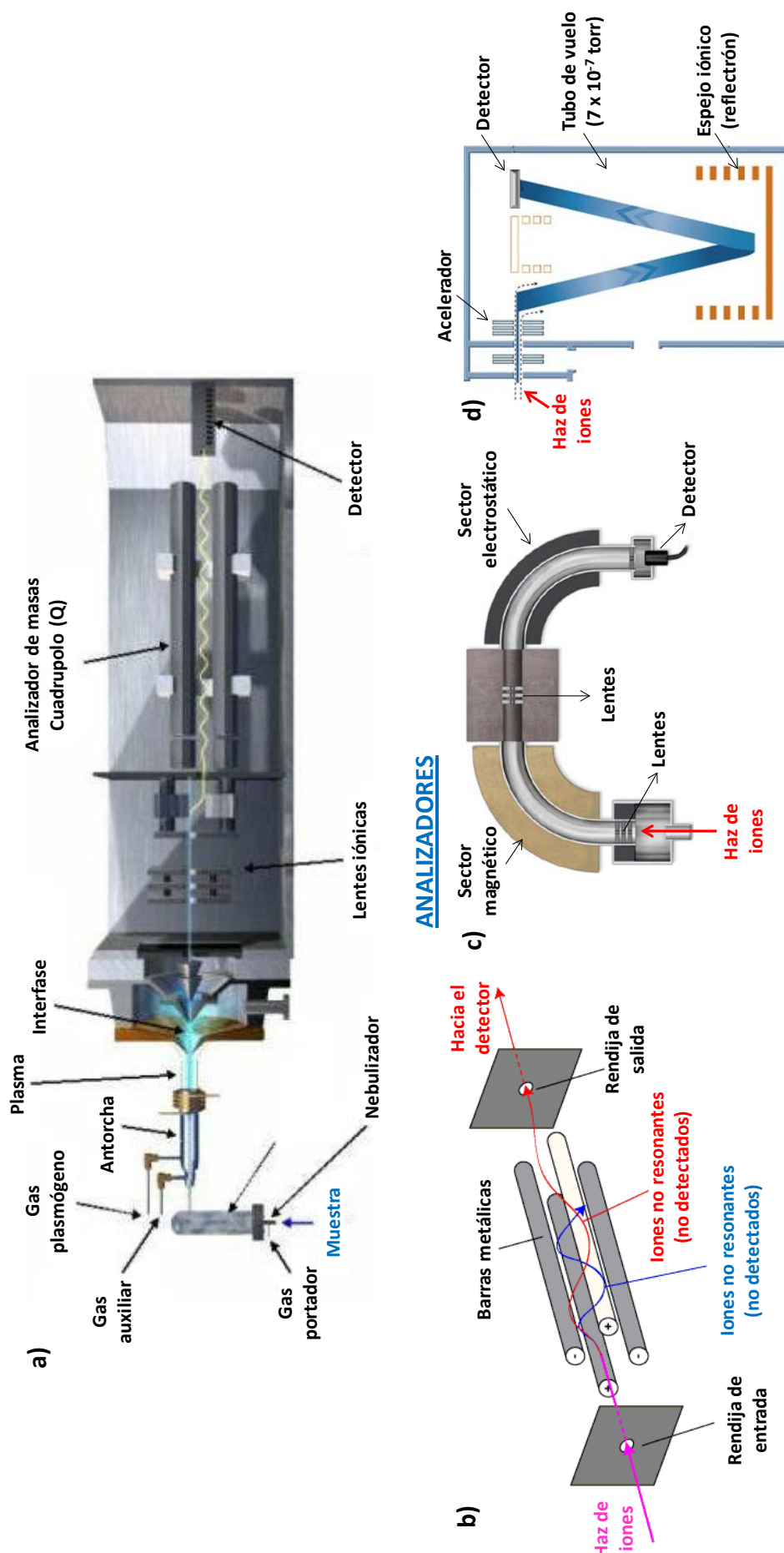


Figura 17. a) Esquema de la técnica de ICP-MS; esquema de un analizador de masas b) tipo cuadrupolo (Q); c) de sector magnético (SF); y d) de tiempo de vuelo (TOF).

2.4.1 Análisis de bioimagen elemental en muestras biológicas mediante LA-ICP-MS

En los últimos años, el interés por el estudio de la **distribución elemental** (fundamentalmente de metales de transición) en muestras biológicas ha ido en progresivo aumento. Las técnicas más empleadas para el análisis de la distribución elemental en muestras sólidas son la fluorescencia de rayos X con radiación de sincrotrón (SXRF) [360], la espectrometría de masas de ión secundario (SIMS) [361], y la técnica LA-ICP-MS [362]. Sin embargo, desde que hace una década Kindness *et al.* publicaran un estudio donde mostraban la posibilidad del análisis mediante LA-ICP-MS para la obtención de la distribución de Cu y Zn en un tejido de hígado [363], esta técnica ha experimentado un gran auge, existiendo hoy en día alrededor de un centenar de trabajos donde se estudian distribuciones elementales en estructuras biológicas nativas mediante esta técnica. En la **Figura 18** se muestra un esquema del modo de operación en LA-ICP-MS.

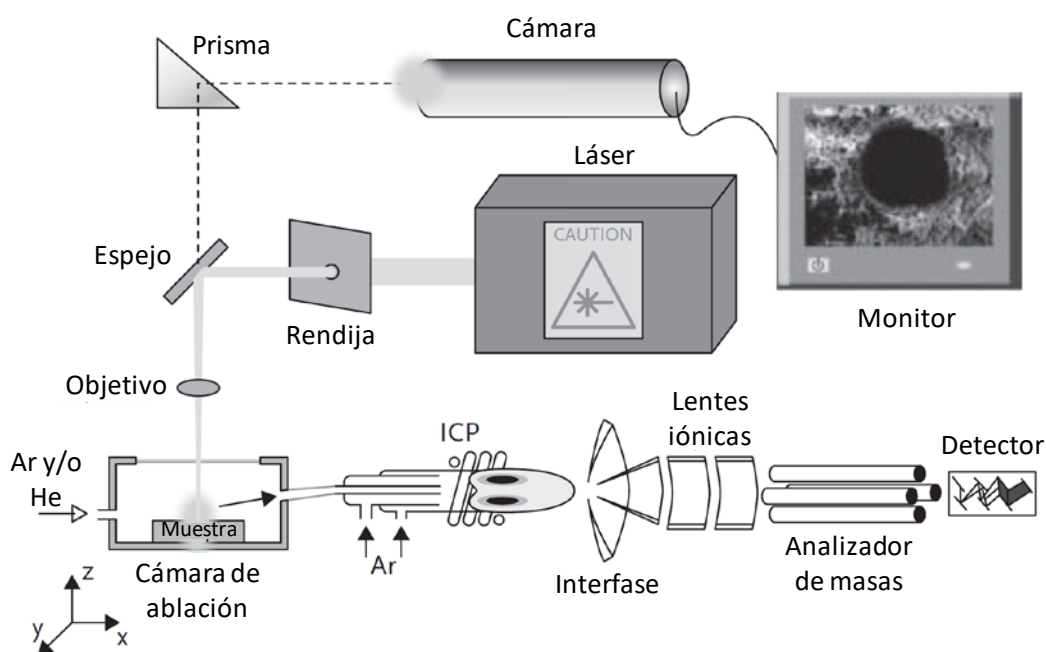


Figura 18. Esquema de la técnica de LA-ICP-MS (adaptado de www.analchem.ugent.be)

El análisis de bioimagen elemental mediante **LA-ICP-MS** ofrece una serie de ventajas frente al resto de técnicas de análisis de superficie, como son: i) bajos límites de detección (del orden de $\mu\text{g g}^{-1}$), gracias a que el aerosol seco procedente de la

muestra es introducido directamente en la antorcha, sin necesidad del empleo de nebulización que disminuye extraordinariamente el aporte de la muestra al plasma; ii) amplio rango dinámico (de hasta 9 órdenes de magnitud); iii) permite realizar un análisis multielemental; iv) minimización de interferencias espectrales por formación de iones poliatómicos (comparado con SIMS); v) la cantidad requerida de muestra es muy pequeña; y vi) capacidad de cuantificar isótopos y elementos traza en secciones de tejido con una alta resolución espacial (entre 10 y 100 μm), lo cual ha permitido aclarar cuestiones básicas en el campo de la biomedicina como la distribución de ciertos elementos en tejidos biológicos. De hecho, los avances conseguidos recientemente en la instrumentación de los sistemas de ablación están permitiendo obtener resoluciones espaciales mucho mejores, inferiores a 1 μm . Cabe esperar que esta excelente resolución permita en un futuro cercano abordar estudios de distribución elemental espacial a nivel celular.

El **tratamiento de la muestra** en esta técnica es mínimo, lo cual es una gran ventaja, ya que la baja manipulación de la misma minimiza los riesgos de alteración de la distribución elemental o de las especies presentes. En este punto, existen diferentes estrategias para el tratamiento de tejidos biológicos. El método empleado tradicionalmente consiste en la perfusión de los tejidos (para eliminar los restos sanguíneos) previamente a su extirpación, seguido de su fijación en formaldehído y deshidratación de los mismos sumergiéndolos en diferentes disoluciones de etanol. Finalmente, los tejidos son embebidos en diferentes tipos de parafinas y seccionados en un micrótopo [364]. No obstante, debido al gran interés desde el punto de vista biológico en que la distribución elemental coincida lo más posible con las condiciones fisiológicas, el empleo de tejidos frescos seccionados parece ser lo más idóneo [365,366]. Si se desean preservar las proteínas, es conveniente que el tejido una vez extirpado se criogenice en N_2 líquido hasta su posterior seccionamiento, realizándose los cortes posteriores en un criostato (cortes entre 5 y 20 μm) y manteniendo las secciones a -80°C hasta su análisis. Finalmente las secciones se analizarán una vez secas a temperatura ambiente en la celda de LA o en una criocelda [367]. En el caso de que sean de interés especies móviles, como aquellas que contienen Na, K o Cl, el tejido puede ser congelado instantáneamente tras su extirpación a -50°C con isopentano y guardado a -80°C hasta su seccionamiento en un criostato [368]. Finalmente, los cortes

se realizan en un micrótopo. Este tipo de tratamiento permite que las muestras sean más fáciles de almacenar y trasladar, sin embargo, para evitar contaminaciones en la fuente del espectrómetro de masas, es recomendable el desparafinamiento previo a su análisis.

Mediante el empleo de LA-ICP-MS en los últimos años se ha estudiado extensamente la distribución de elementos tanto exógenos como endógenos en multitud de tejidos de relevancia clínica. J.S. Becker ha publicado recientemente las principales aplicaciones de esta técnica de bioimagen y las perspectivas futuras de la misma [369]. Sin embargo, en el área de los **fármacos antitumorales con base de Pt**, son pocos los trabajos que existen donde se estudia su distribución en tejidos [259,370–374]. En este sentido y en relación con la nefrotoxicidad, Moreno-Gordaliza *et al.* describieron recientemente estudios de bioimagen donde se observa una mayor acumulación de cisplatino en la corteza renal frente a la zona medular [259], en concreto en la región cortico-medular, hecho que explica el daño observado en las células epiteliales del túbulo proximal renal que se localizan en dicha zona y que ha sido comentado en el apartado 1.6.

2.4.1.1 Metodologías de estandarización interna de la señal obtenida por LA-ICP-MS

Durante el **proceso de ablación** de la muestra, existen numerosos **factores que pueden influir en la señal analítica** obtenida, desde la composición de la muestra a las condiciones instrumentales empleadas [375]. Diferentes autores han estudiado el fenómeno físico conocido como “fraccionamiento” [376], que básicamente consiste en un proceso dinámico que incluye la volatilización, vaporización, ionización y transporte selectivos de los elementos traza ablacionados, que origina una representación no estequiométrica de la composición de la muestra. Se ha demostrado que este fenómeno tiene su origen en la evaporación preferencial inducida por el láser de elementos volátiles frente a los no volátiles, en la diferenciación elemental dependiente del tamaño de partícula, o en el fraccionamiento específico isotópico [377,378]. En resumen, se puede concluir que la eficacia de la técnica LA se ve afectada por la irradiación del láser, longitud de onda, longitud de pulso, relación profundidad/diámetro del cráter formado, factores mineralógicos de la muestra, composición de la matriz, y modo de ablación [379,380]. Además del efecto del

fraccionamiento, la señal elemental se puede ver modificada por fluctuaciones en la potencia del láser, falta de homogeneidad en la matriz de la muestra, variaciones en la masa y la eficiencia de transporte al plasma del material ablacionado, o la propia inestabilidad de la señal del ICP-MS.

Debido a lo comentado anteriormente, y considerando que el tiempo necesario para obtener la bioimagen de un tejido es considerable (del orden de 5 horas para una sección de unos 200 mm²), la comparación de las señales obtenidas para diferentes muestras o tejidos analizados en diferentes sesiones de medida se convierte en una tarea complicada. Por todo ello se hace necesario el empleo de protocolos de **normalización de la señal**. El procedimiento más habitual de normalización consiste en realizar una **estandarización interna** de las señales mediante la medida simultánea de un **patrón interno (PI)**. Sin embargo, a diferencia del análisis directo por ICP-MS, la elección de un PI adecuado para LA es complicado. En el caso del análisis de tejidos, diversos autores han propuesto el empleo de ¹³C como PI [381,382]. Como ejemplo, cabe citar el trabajo de Feldmann *et al.* en el que describen una mejora en la RSD de la señal de ⁶³Cu obtenida de un material de referencia certificado mediante la estandarización interna con ¹³C [367]. Recientemente, Austin *et al.* han evaluado el ¹³C como PI en estudios de bioimagen, poniendo de manifiesto que, si bien el ¹³C no es la opción ideal, es un buen candidato como PI debido a su buena resolución con respecto al pico adyacente y de alta abundancia de ¹⁴N, y a su respuesta lineal con respecto a la cantidad de masa ablacionada [381]. Sin embargo, diversas desventajas han obstaculizado su aplicación generalizada, como son su elevado primer potencial de ionización, o su diferente comportamiento en el transporte al plasma comparado con los elementos de transición biológicamente relevantes, y especialmente, en el caso del análisis de elementos pesados, donde la masa de este elemento difiere mucho de la de los analitos. En este punto, Frick y Günther han realizado una rigurosa evaluación de los aspectos físico-químicos fundamentales de este procedimiento, concluyendo que el isótopo ¹³C no es adecuado para la estandarización interna de la señal [383]. Otro procedimiento empleado para la normalización de la señal en LA-ICP-MS consiste en la aplicación de láminas en la superficie, o por debajo de la muestra. Austin *et al.* propusieron la aplicación encima de la muestra de finas láminas poliméricas de polimetilmetacrilato dopadas con metales [384]. En esta línea, Konz *et al.*

desarrollaron una metodología basada en la deposición electroquímica de una capa de Au^+ sobre la superficie del tejido [385], metodología que ha sido adoptada posteriormente por otros autores [386]. Más recientemente, Hoesl *et al.* han desarrollado una metodología original basada en la deposición de una fina lámina de PI sobre la superficie de membranas de nitrocelulosa mediante la impresión de tintas comerciales enriquecidas con In y diferentes lantánidos (seleccionados como PI) con una impresora convencional, con el fin de cuantificar mediante LA-ICP-MS las proteínas transferidas a las membranas tras ensayos de Western-Blot [387].

2.4.1.2 Obtención de distribuciones elementales cuantitativas mediante LA-ICP-MS

Conseguir un **análisis cuantitativo** robusto y fidedigno en el análisis por LA-ICP-MS es un objetivo de sumo interés pero difícil de alcanzar. La cuantificación de elementos traza mediante LA-ICP-MS, al igual que en otras técnicas de la química analítica, requiere una calibración adecuada y la comparación con materiales de referencia totalmente caracterizados. Sin embargo, la obtención de materiales de referencia apropiados para todos los tipos de muestras analizadas habitualmente por LA-ICP-MS sigue siendo un reto. Desde un punto de vista biológico, se requiere una cuantificación exacta para evaluar si la variación de un elemento dentro de una muestra es significativa o simplemente es debido a la heterogeneidad típica de los sistemas biológicos. Incluso en el caso de matrices con propiedades físico-químicas similares, como los tejidos biológicos, hoy en día aún se debate si sería apropiada la existencia de un método universal para la cuantificación por LA-ICP-MS, e incluso si dicho método puede llegar a conseguirse. Por tanto, el estudio de metodologías que permitan realizar una correcta calibración y cuantificación es de gran interés.

Existen diferentes estrategias para la calibración y cuantificación de muestras mediante LA-ICP-MS. Puesto que el fenómeno del fraccionamiento elemental es altamente dependiente de la matriz de la muestra, uno de los procedimientos más utilizados es el empleo de materiales de referencia matriciales o, como se denominan más comúnmente, “**matrix matched standards**” (MMS). El empleo de patrones con una matriz igual (o lo más parecida posible) a la de las muestras permite corregir tanto los efectos de fraccionamiento como los efectos matriz producidos en el ICP-MS. En este punto, existen dos procedimientos alternativos para realizar la calibración y

cuantificación mediante LA-ICP-MS: el empleo de **materiales de referencia estándar (SRMs)** o la fabricación en el laboratorio de **MMS personalizados** según las necesidades. Comercialmente, existen numerosos SRMs para diversos tipos de matrices sólidas como cristal, cerámica, cemento, metales, etc. Los SRMs para tejidos biológicos disponibles comercialmente se muestran en la **Tabla 4**. Éstos se presentan como polvo liofilizado y se encuentran disponibles para hígado, hueso, músculo, suero, ostra, mejillón, langosta, hojas de la manzana, tomate y melocotón entre otros. Sin embargo, estos SRMs no cubren todo el rango de tipo de muestras analizadas habitualmente. Por ello, en los último años muchos laboratorios preparan sus MMS personalizados en función de las necesidades y de la matriz de cada tipo de muestra. La calibración externa empleando estos MMS personalizados ha sido empleada para la cuantificación mediante LA-ICP-MS obteniéndose resultados satisfactorios. Becker *et al.* fueron los primeros en utilizar los MMS preparados en el laboratorio para el análisis cuantitativo por bioimagen [388,389]. Desde entonces, son numerosas las publicaciones existentes desarrollando MMS para diferentes muestras biológicas con el mismo fin [265, 285–289]. Los MMS personalizados suelen prepararse mediante una homogeneización de tejidos control, los cuales son enriquecidos posteriormente con el analito de interés. Los pellets de tejido enriquecido son almacenados a -80°C hasta su posterior seccionamiento mediante un criostato. Finalmente, para la determinación de la cantidad exacta de analito contenido en dichos patrones se realiza la digestión de los mismos y el análisis por ICP-MS [393–395]. Sin embargo, un aspecto crucial a tener en cuenta en la preparación de estos patrones reside en la homogeneidad que presentará el analito en la matriz preparada.

Tabla 4. SRMs para muestras biológicas disponibles comercialmente (adaptado de Hare et al. [392])

SRM	Tipo	Elementos certificados
ERM-BB384	Músculo de cerdo	Ca, Mg, Na
BCR-273	Proteína celular	Ca, Fe, K, N, P, Mg*, N*, Na*, S*
BCR-274	Proteína celular	As, Cd, Co, Cu, Mn, Pb, Se, Zn, Ni*
BCR-185R	Hígado bovino	As, Cd, Cu, Mn, Pb, Se, Zn
BCR-278	Tejido de mejillón	Hg, Cd, Cr, Se, Pb, As, Mn, Zn, Cu
NCS ZC71001	Hígado de ternera	Ca, Cl, Co, Cu, Fe, K, Mg, Mn, Mo, Na, P, Rb, Se, Sr, Al*, Ba*, Br*, Cd*, F*, Hg*,
NCS ZC73016	Pollo	Ag, As, B, Ba, Bi, Br, Ca, Ce, Cl, Cr, Cs, Cu, Dy, Fe, Hg, K, La, Li, Mg, Mn, Mo, N, Na, Nd, Ni, P, Rb, Pr, Sb, S, Se, Sm, Sr, Y, Zr
RM 8414	Polvo de músculo bovino	Al, As, B, Br, Ca, Cd, Cl, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, I, K, Mg, Mn, N, Na, Ni, P, Pb, Rb, S, Se, Sr, Zn, Ba*, Cs*, F*, Sb*, V*
NIST-1546	Homogeneizado de carne	Ca, Fe, Na
NCS ZC81001	Músculo de cerdo	Br, Ca, Cl, Cu, Fe, K, Mg, Mn, N, Na, P, Rb, Se, Zn, Ba*, Co*, Cr*, Cs*, Hg*, Mo*, Pb*,
ERM-CE278	Tejido de mejillón	As, Cd, Cr, Cu, Hg, Mn, Pb, Se, Zn
BCR-668	Tejido de mejillón	Ce, Dy, Er, Eu, Gd, La, Lu, Nd, Pr, Sm, Tb, Th, Tm, U, Y, As*, Cd*, Co*, Cr*, Cs*, Ho*, Fe*, Mo*, Sc*, Yb*, Zn*
NIST-2997	Tejido de mejillón	Cd, Cu, Pb, Ni, Sr
NIST-1946	Tejido de pescado	As, Cu, Fe, Hg, Mn, Rb, Se, Zn, metil-Hg
NIST-1947	Tejido de pescado	As, Cu, Fe, Hg, Mn, Rb, Se, Zn
NIST-1566b	Tejido de ostra	Ca, Cl, Mg, K, Na, S, Al, As, Cd, Co, Cu, Fe, Pb, Mn, Hg, Ni, Rb, Se, Ag, Th, V, Zn
IAEA-407	Pescado	Al, As, Br, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, K, Li, Mg, Mn, Na, Ni, Pb, Rb, Sb, Se, Sr, V, Zn
DORM-3	Proteína de pescado	As, Cd, Co, Cr, Fe, Hg, Ni, Pb, Sn, Zn
NIST 1515	Hojas de manzana	Al, As, Ba, Bo, Ca, Cd, Cl, Cu, Fe, Hg, K, Mg, Mn, Mo, N, Na, Ni, P, Rb, Se, Sr, V, Zn
NIST-1575a	Agujas de pino	Al, Ba, Ca, Cd, Cl, Cu, Fe, Hg, K, P, Rb, Zn, As*, B*, Ce*, Ce*, Cr*, Cs*, Mn*, Na*,
NIST-1570a	Hojas de espinaca	Al, As, B, Ca, Cd, Co, Cu, Hg, K, Mn, Ni, P, Sr, Th, V, Zn
NIST-1573a	Hojas de tomate	Al, As, B, Ca, Cd, Cr, Co, Cu, Fe, Hg, K, Mn, N, Na, Ni, P, Rb, Sb, Se, V, Zn, Ag*, Ba*, Br*, Ce*, Cs*, Cl*, Gd*, Hf*, I*, La*, Mo*,
NIST-1547	Hojas de melocotón	Al, As, B, Ba, Br*, Ca, Cd, Ce*, Cl, Co*, Cr*, Cu, Eu*, Fe, Ga*, Hg, I*, K, La*, Mg, Mn, Mo, N, Na, Nd*, Ni, P, Pb, Rb, S*, Sm*, Sb*, Se, Sn*, Sr, Tb*, U*, V, Yb*, Zn
NIST-1598a	Suero animal	Cd, Co, Cs, Cu, Fe, Mn, Ni, Rb, Sb, Se, V, Zn, Al*, Ca*, Cr*, Hg*, Mo*
NIST-1486	Harina de huesos	Ca, Fe, K, Mg, P, Pb, Sr, Zn, Al*, As*, C*, Cd*, Cu*, F*, Mn*, Se*
NIST-1400	Cenizas de huesos	Ca, Fe, K, Mg, P, Pb, Sr, Zn
FEBS-1	Otolitos de peces	Ba, Ca, Li, Mg, Mn, Na, Sr, Cd*, Cu*, Ni*,
DOLT-4	Hígado de cazón	Ag, As, Cd, Cu, Fe, Hg, Pb, Ni, Se, Zn, metil-Hg, Al*, Ca*, Co*, Cr*, K*, Mg*,
LUTS-1	Hepatopancreas de langosta	Ag, As, Ca, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Pb, Mg, Mn, Ni, K, Se, Sr, Zn
TORT-2	Hepatopancreas de langosta	As, Cd, Co, Cr, Cu, Fe, Hg, Pb, Mn, Mo, Ni, Se, Sr, Vm, Zn, metil-Hg, Sb*
* Materiales no certificados		

Otra estrategia empleada para la obtención de bioimágenes cuantitativas es la **adición “online”** durante el análisis LA-ICP-MS de disoluciones que contienen los patrones de interés [396,397]. Esta metodología se lleva a cabo mediante la colocación de un nebulizador dentro de la cámara de ablación, lo que permitirá la adición de cantidades conocidas de patrón durante el proceso de ablación. En este punto, se han abordado diferentes alternativas de adición del aerosol, colocando el nebulizador antes [398] o después [399] de la cámara de la muestra. En este punto, Boulyga *et al.* [400] han descrito que mientras que la adición del aerosol antes de la cámara de ablación aumenta los efectos de fraccionamiento, la introducción post-celda puede disminuir el efecto matriz. Sin embargo, el inconveniente de esta metodología reside en el aumento del contenido acuoso que se introduce con el aerosol con respecto a las partículas ablacionadas, que son analizadas habitualmente como un plasma seco. Esto limita la respuesta elemental, por lo que se ha investigado la producción de aerosoles secos con propiedades similares a las partículas ablacionadas [401]. Además, la dilución del material ablacionado que se produce en las líneas de transporte puede afectar negativamente a la sensibilidad. Günther *et al.* han reportado una disminución en la sensibilidad del 20 al 35% empleando esta metodología [399]. La metodología de adición “online” asume que los efectos del fraccionamiento no se producen, aunque diversos autores han observado que la heterogeneidad de la muestra puede dar lugar a efectos de fraccionamiento que pueden ser mitigados, pero no eliminados [402]. A pesar de todo, algunos estudios de calibración realizados empleando esta estrategia han demostrado cierta correlación con algunos MMS. Por ejemplo, O’Connor *et al.* han reportado recuperaciones entre el 90 y el 99% en el análisis de estándares de acero, cristal y plásticos empleando esta metodología [403]. Sin embargo, el empleo de esta estrategia para obtener bioimágenes cuantitativas por LA-ICP-MS es limitado. Becker *et al.* han modificado el diseño experimental propuesto inicialmente por Pickhardt *et al.* ([397]) para su aplicación a la cuantificación y validación de los MMS personalizados preparados para experimentos de bioimagen [389].

En los últimos años, se han propuesto diversas metodologías innovadoras para realizar cuantificaciones en experimentos de bioimagen cuyo fundamento consiste en la aplicación de una metodología tradicional dentro del área de Química Analítica como es el análisis por dilución isotópica. La **espectrometría de masas con dilución**

isotópica (IDMS) fue introducida en los años 50 convirtiéndose en una de las vías de cuantificación más precisa y exacta de la Química Analítica. Antes de la década de los 90, la determinación cuantitativa de elementos traza o, menos frecuentemente, la especiación realizada mediante IDMS se realizaba casi exclusivamente por ionización térmica (TI-IDMS) [404]. Por otra parte, hasta esa época la determinación cuantitativa de elementos traza por ICP-MS solía realizarse mediante calibración externa con soluciones estándar o por el método de adiciones estándar. Sin embargo, desde la publicación de diversos estudios donde se utiliza la IDMS con ICP-MS tanto para determinaciones elementales totales como para estudios de especiación con resultados satisfactorios [405–408], su aplicación ha ido en aumento. La aplicación de la de ID en análisis cuantitativos de bioimagen se describe en la bibliografía recientemente abordando dos procedimientos experimentales diferentes: mediante el empleo de *pellets* prensados [409], o combinada con la estrategia mencionada anteriormente de adición “*online*” [397,410]. Sin embargo, aunque con estos procedimientos se han obtenido resultados satisfactorios para análisis de concentraciones totales, no resulta factible para la obtención de bioimágenes bidimensionales cuantitativas. Este hecho puede ser debido a la dificultad que presentan los análisis de IDMS, en los que se necesita un cuidadoso diseño experimental y de preparación de la muestra. En este punto, Moser *et al.* demostraron que la contribución de la preparación de la muestra y la heterogeneidad de la misma a la incertidumbre general del proceso supera a la contribución de todas las demás fuentes de error [411]. Este es el principal problema que impide hoy en día la aplicación de la IDMS en los estudios de bioimagen, la obtención de una distribución totalmente homogénea del isótopo enriquecido sobre los tejidos.

Todo lo comentado anteriormente pone de manifiesto la necesidad de desarrollar nuevas estrategias de bioimagen que permitan obtener información elemental espacial y cuantitativa con elevada resolución y sensibilidad.

2.5 Técnicas de espectrometría de masas molecular para la identificación de complejos metal-proteína

Las estrategias analíticas para la identificación de proteínas ligadas a metales requieren la combinación de las técnicas de espectrometría de masas elemental y molecular, ya que como se ha indicado en el apartado anterior, mediante el análisis por ICP-MS cualquier información estructural se pierde durante el proceso de ionización. Por tanto, para la identificación estructural de proteínas es necesario el empleo de fuentes de ionización más “suaves” que el ICP-MS, como la ionización/desorción por láser asistida con matriz (*“matrix-assisted laser desorption/ionization”*, MALDI) o la ionización por electronebulización o electrospray (*“electrospray ionization”*, ESI). Estas fuentes de ionización “blandas” en principio, y en función de la estructura del complejo metal-biomolécula, pueden mantener la estructura de las biomoléculas y minimizar la rotura de los enlaces metal-proteína, por lo que son las técnicas más utilizadas tanto en el campo de la proteómica funcional como en metalómica, para el análisis de biomoléculas ligadas a metales. En la **Figura 19** se muestra esquemáticamente las fuentes de ionización MALDI y ESI, las cuales se describirán brevemente a continuación.

2.5.1 Espectrometría de masas MALDI-MS

La metodología **MALDI** está basada en la ionización en fase gaseosa de biomoléculas (proteínas, ADN, péptidos, azúcares, etc.) y moléculas orgánicas de gran tamaño (como polímeros, dendrímeros y macromoléculas), y consta de tres etapas: en primer lugar, la muestra se mezcla con una matriz adecuada y se deposita sobre una placa metálica, donde co-cristalizan (relación matriz:analito superior a 1000:1); seguidamente, tras el secado de la muestra, se produce la irradiación de la muestra con un láser, lo que provoca la ablación y desorción de la muestra y la matriz de la placa metálica; finalmente, los analitos son ionizados y acelerados hacia el analizador de masas (**Figura 19**) [412]. La matriz empleada consiste en moléculas cristalizadas de ácidos orgánicos, de los cuales los más empleados son el ácido α -ciano-4-hidroxicinámico (CHCA o α -ciano), para péptidos y proteínas menores de 10 kDa; el

3,5-dimetoxi-4-hidroxicinámico (ácido sinapínico), para proteínas grandes de más de 10 kDa; y el ácido 2,5-dihidroxibenzoico (DHB), para el análisis de moléculas pequeñas como péptidos, fosfopéptidos, polímeros, etc. La matriz suele disolverse en un medio orgánico que contiene algún ácido volátil (como el TFA), cuya función es aportar los H^+ necesarios para la ionización. La función de la matriz consiste en facilitar la ionización de los analitos, ya que las moléculas cristalizadas de la misma absorben fuertemente la energía incidente del láser, pasando al estado gaseoso junto con los analitos. Seguidamente, los analitos son ionizados en fase gaseosa por transferencia de carga entre la matriz y el analito, generándose principalmente iones de carga +1 (a diferencia de la técnica ESI, donde los iones generados son de carga múltiple). Finalmente, los iones son extraídos mediante un potencial de extracción y acelerados hacia el espectrómetro de masas.

Tanto en la técnica MALDI como en ESI, los analizadores de masas empleados pueden ser de distinto tipo en función de las necesidades específicas de cada laboratorio. El analizador más empleado en la técnica de MALDI es el TOF (comentado en el apartado anterior), debido a su amplio rango de masas y a su modo de medida pulsante, que puede sincronizarse con los pulsos del láser. La sensibilidad de este analizador es elevada, aunque su resolución se limita a valores de $m/\Delta m$ de 10000-20000. Habitualmente, los analizadores TOF contienen un espejo reflector (reflectrón) que refleja los iones mediante un campo eléctrico duplicando así su tiempo de vuelo, lo que aumenta la resolución.

En 2008, esta técnica fue propuesta para realizar estudios de bioimagen molecular, donde la matriz es depositada uniformemente sobre las secciones de la muestra a analizar [413]. Recientemente, Bianga *et al.* [414] han descrito la complementariedad de las técnicas LA-ICP-MS y MALDI para el estudio por bioimagen de la distribución de fármacos antitumorales de Pt en tumores humanos.

En cuanto al análisis de proteínas coordinadas con metales, cabe destacar que MALDI parece ser menos apropiado que ESI con respecto a la conservación del enlace metal-proteína, el cual puede verse afectado durante la ionización. Además, también se han observado pérdidas de los ligando asociados a los metales. Diversos estudios apuntan a que este hecho es muy dependiente del tipo de matriz escogida para el análisis y de su forma de preparación, aunque también dependerá de la naturaleza del

complejo metálico [415,416]. Sin embargo, tras una cuidadosa optimización de la matriz y condiciones de análisis, esta técnica puede ser una alternativa sencilla para el estudio de algunos complejos metálicos.

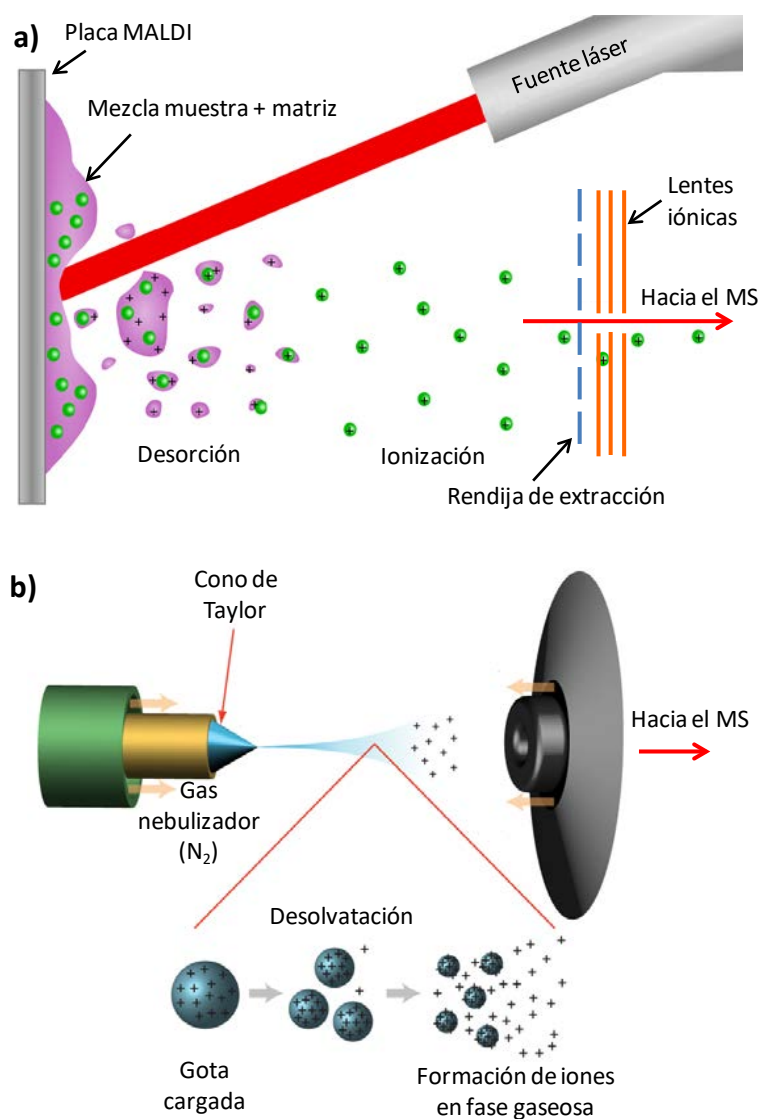


Figura 19. Esquema de las fuentes de ionización a) MALDI y b) ESI (adaptado de Dahlin, A.)[417]

2.5.2 Espectrometría de masas ESI-MS

La técnica de **ESI** consiste en una ionización a presión atmosférica en la que los analitos (generalmente procedentes de una cromatografía líquida) son introducidos a través de un tubo capilar (diámetro interno de 100 μm aproximadamente) a caudales de entre 1 y 20 $\mu\text{L min}^{-1}$. Sobre el extremo del tubo capilar de acero inoxidable (situado

de forma perpendicular a la parte frontal del espectrómetro de masas) se aplica un potencial elevado de 3-4 kV, para la nebulización e ionización de la muestra líquida emergente del capilar. Las gotas formadas poseen una elevada carga superficial, las cuales se van convirtiendo en gotas de menor tamaño tras el proceso de desolvatación. Es por ello que en esta técnica los disolventes empleados son mezclas acuosas con disolventes orgánicos volátiles como acetonitrilo o metanol. Además, se añaden compuestos que aumentan la conductividad, como por ejemplo el ácido fórmico. Para favorecer el proceso de nebulización y desolvatación, existe un flujo de gas (generalmente N_2) alrededor del capilar. Una vez creadas las gotas, éstas son transportadas desde la zona a presión atmosférica al interior del espectrómetro de masas por gradiente de presión. Como puede observarse en la **Figura 19**, durante el transporte, las gotas de aerosol formadas inicialmente y con una elevada carga superficial van disminuyendo su tamaño por evaporación del disolvente, aumentando así su densidad de carga. Cuando las fuerzas repulsivas entre las cargas superan la tensión superficial de la gota, se produce una desorción directa de los iones del analito en fase gas desde la gota, lo que se conoce como la explosión de Coulomb. Finalmente, los iones cargados desolvatados son acelerados hacia el analizador de masas por la acción de campos eléctricos, eliminándose las moléculas de disolvente no cargadas. A diferencia de la fuente de ionización MALDI, los iones obtenidos en ESI suelen ser de carga múltiple, del tipo $[M+nH]^{n+}$ y $[M-nH]^{n-}$ según se trabaje en modo de ionización positivo o negativo. Además, debido a las condiciones de trabajo a presión atmosférica y temperaturas no muy elevadas, la ionización es extremadamente suave, por lo que se obtienen iones cuasi-moleculares intactos, lo que hace de esta técnica una herramienta de gran utilidad para el análisis de proteínas. En este punto, la técnica de ESI-MS es más adecuada para la caracterización de biomoléculas ligadas a metales, ya que, debido a su ionización más suave conserva en mayor grado los complejos con metales así como los ligandos externos asociados al metal, permitiendo realizar una dilucidación más sencilla de la estructura original [418].

La técnica de ESI se emplea para el análisis de proteínas, péptidos, oligonucleótidos pequeños, biopolímeros y carbohidratos, presentando un LD del orden de los fmol. Es aplicable para moléculas con un peso molecular de hasta 200 kDa, y puede medir tanto iones positivos como negativos. Una de las principales

ventajas de esta técnica es su fácil acoplamiento a técnicas de separación, lo que la convierte en la principal elección para el análisis de biomoléculas ligadas a elementos metálicos, como se expondrá más adelante en el apartado 2.6. Sin embargo, un inconveniente que presenta es la poca tolerancia a sales o agentes solubilizantes como detergentes, lo que hace necesarias etapas previas de limpieza y desalado. En los últimos años se ha desarrollado la versión miniaturizada **nanospray (nESI)**, que permite trabajar a caudales de nL min^{-1} . En nESI, el capilar empleado posee entre 1 y 3 μm de diámetro interno. La infusión mediante nESI presenta la ventaja de requerir muy poca cantidad de muestra (del orden de pocos μL), además de presentar una mejor eficiencia de ionización, desolvatación y transferencia de los iones, lo que se traduce en una elevadísima sensibilidad (fmol).

Al igual que en MALDI, en la técnica de ESI pueden emplearse diversos analizadores, desde analizadores tipo Q a TOF. Sin embargo, en proteómica y metaloproteómica suele ser más comunes las trampas de iones (IT). A continuación se describen algunas de las IT más empleadas (**Figura 20**):

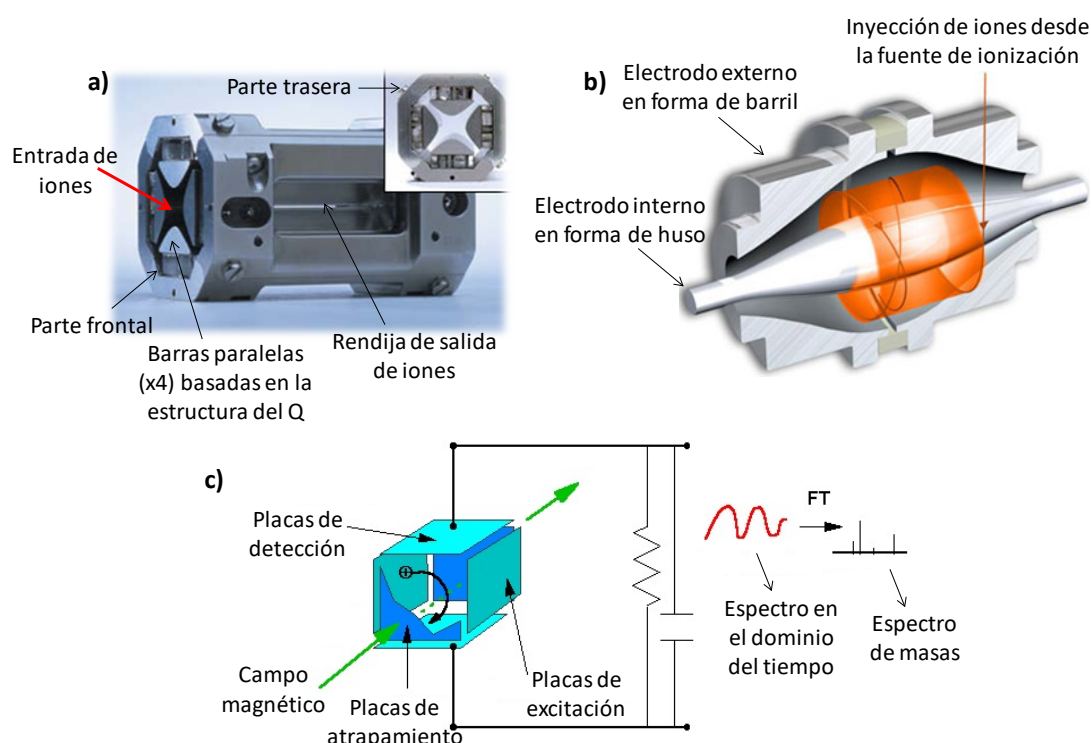


Figura 20. Esquema de los analizadores de trampas de iones a) trampa lineal de iones; b) Orbitrap; y c) analizador de resonancia iónica ciclotrónica por transformada de Fourier (FT-ICR)

- **Trampa de iones lineal (LIT, LTQ):** Este tipo de trampas se basan en la configuración de un cuadrupolo, con cuatro barras paralelas cortadas en tres secciones con una ranura longitudinal en dos barras de la sección central para la extracción de iones, a las que se añaden dos electrodos adicionales a la entrada y la salida, de forma que por aplicación de potenciales de radiofrecuencias y corriente continua se forma un campo eléctrico tridimensional que permite almacenar y analizar iones en la cavidad de la trampa. Durante la detección, los potenciales de los electrodos se alteran para provocar inestabilidad en las trayectorias de los iones y expulsarlos en la dirección axial (los iones seleccionados son extraídos radialmente a través de las ranuras practicadas en las barras de los electrodos) en función de su relación m/z dando lugar al espectro de masas (MS). Este analizador presenta una sensibilidad del orden de fmol, resoluciones entre 2000 y 10000, y una exactitud en la masa en el intervalo de 100-500 ppm.

- **Orbitrap:** Este moderno analizador, desarrollado en el 2000 por Alexander Makarov, se basa en un electrodo exterior en forma de barril y un electrodo interior coaxial que forma un campo electrostático con distribución potencial cuadrilóglogarítmica [419]. Los iones inyectados tangencialmente al campo eléctrico creado entre los electrodos quedan atrapados rotando alrededor el electrodo central. Adicionalmente, los iones también se mueven delante y detrás a través del eje del electrodo central. Así, los iones con una relación m/z específica se mueven en anillos que oscilan alrededor del huso central, siendo la frecuencia de estas oscilaciones armónicas independiente de la velocidad del ion e inversamente proporcional a la raíz cuadrada de la relación m/z . Finalmente, la aplicación de la transformada de Fourier (FT) a las frecuencias de oscilación de los iones proporciona el espectro de masas. Este analizador presenta una serie de ventajas respecto a otras IT como son su elevadísima resolución (30000-100000), exactitud (2-5 ppm) y sensibilidad (fmol), además de presentar un elevado rango dinámico con respecto a los demás analizadores. Sin embargo, como inconveniente presenta su elevado coste.

- **Analizador de resonancia iónica ciclotrónica por transformada de Fourier (FT-ICR):** Este analizador está basado en la aplicación de un campo magnético intenso ($B > 4T$) sobre la trayectoria de los iones, y posterior medida de su frecuencia de resonancia ciclotrónica, que será igual para todos aquellos iones de igual m/z

independientemente de su velocidad inicial. Finalmente los iones emiten una señal de radiofrecuencias en función de su m/z , la cual se recoge en un receptor, se amplía, y mediante la FT se convierte la función en el dominio del tiempo obtenida en un espectro de masas. A pesar de que la velocidad de barrido de este analizador es inferior a las trampas de iones, su elevadísima resolución (50000-100000), sensibilidad (fmol) y exactitud en la determinación de la masa (<2ppm) lo hace de gran utilidad para la detección de masas exactas, aunque su coste es muy elevado.

2.5.3 Espectrometría de masas en tándem (MS/MS)

Los iones moleculares proporcionados por las fuentes de ionización MALDI y ESI proporcionan información acerca del peso molecular de las especies estudiadas. Sin embargo, para obtener información estructural, es necesario realizar la fragmentación de dichos iones moleculares y estudiar las relaciones m/z asociadas a los fragmentos producidos, lo que se conoce como espectrometría **de masas en tándem (MS/MS)**. En el campo de la metalómica, la espectrometría MS/MS permite no sólo la identificación de la especie ligada a un elemento metálico, sino la determinación de la posición o región de la biomolécula donde se encuentra coordinado dicho elemento.

Los instrumentos de MS/MS pueden ser de dos tipos en función de cómo se realice el experimento:

- En los *instrumentos tándem en el espacio*, un primer analizador de masas (MS1) selecciona el ión correspondiente a un determinado valor de m/z , denominado Ión Precursor, el cual se introduce seguidamente en una cámara de colisión donde se fragmenta generando numerosos iones que serán caracterizados en un segundo analizador (MS2). Los instrumentos del tipo MS/MS en el espacio pueden presentar configuraciones muy diversas en función de las diferentes combinaciones de los analizadores, como por ejemplo ESI-Q-Q-Q, ESI-Q-TOF, ESI-Q-Orbitrap, etc.
- En los *instrumentos tándem en el tiempo*, las etapas de aislamiento, fragmentación y análisis se producen en una sola cavidad siguiendo una secuencia temporal. Por ello, se emplea un único analizador, del tipo de trampa de iones. La ventaja de estos analizadores es que permiten aislar fragmentos generados en el

espectro de MS^2 para fragmentarlos nuevamente, pudiéndose repetir el proceso n veces (MS^n), lo cual facilita el proceso de identificación de las especies.

Con respecto a la fragmentación de los iones moleculares en el análisis de proteínas y péptidos, cabe destacar que existen diferentes métodos de fragmentación, los cuales se resumen brevemente a continuación:

- **Disociación inducida por colisión (CID):** Es el método de fragmentación más comúnmente empleado en el análisis de proteínas y péptidos [420]. Se basa en la fragmentación de iones en fase gaseosa en dos etapas: una activación del ión precursor por colisiones con átomos de un gas inerte (He, Ar), seguido de una disociación por transformación de la energía translacional del ión en energía interna, lo que conduce a su fragmentación. La información obtenida a partir de los iones resultantes de la fragmentación de proteínas o péptidos depende de las condiciones empleadas en la fragmentación, como la energía traslacional relativa entre los iones y las moléculas de gas, el potencial aplicado, el número de colisiones que tienen lugar, etc. La fragmentación de péptidos mediante este método se explica mediante el modelo del “protón móvil”[421], que supone que la fragmentación está dirigida por la carga. Por ello, la ruptura se produce principalmente entre los enlaces peptídicos, produciendo iones del tipo “b-” e “y-” (**Figura 21**). Además, pueden producirse pérdidas de moléculas neutras (principalmente H_2O y NH_3) y fragmentos internos, entre otros. Los espectros de masas producidos por este tipo de fragmentación presentan fragmentos con intensidades de señal muy diversas.

- **Disociación por colisión a alta energía (HCD):** Este tipo de fragmentación es una variante de la fragmentación CID específica de los espectrómetros de masas que disponen de un Orbitrap, en la que la fragmentación tiene lugar fuera de la trampa [422]. Este tipo de fragmentación era inicialmente conocido como “disociación en C-trap a alta energía”. En este tipo de fragmentación los iones pasan a través de la C-trap y posteriormente se introducen en la celda tipo octopolo HCD, donde tiene lugar la disociación. Finalmente, los iones se devuelven a la C-trap antes de su inyección en el Orbitrap para el análisis de masas. En la fragmentación por HCD no existe la problemática de falta de estabilidad de las masas bajas que tiene lugar en la fragmentación por CID, lo que permite la obtención de iones en la región de masas bajas que pueden actuar como marcadores específicos

que podrían ser de gran utilidad para la cuantificación mediante iTRAQ en el campo de la proteómica.

- **Disociación por captura de electrones (ECD):** Este método se basa en la fragmentación de las cadenas peptídicas por la energía exotérmica generada tras la captura de un electrón por un péptido de carga múltiple en una célula de ICR [423]. Los iones producidos principalmente tras este tipo de fragmentación son del tipo “c-” y “z-” (**Figura 21**), debido a la ruptura de enlaces N-C α , aunque también pueden generarse algunos fragmentos del tipo b/y. La ventaja de este tipo de fragmentación es que preserva las modificaciones postransduccionales que suelen perderse en la fragmentación por CID. En los espectros de masas que produce este tipo de fragmentación se observan fragmentos de intensidad de señal similar.

- **Disociación por transferencia de electrones (ETD):** Similar al método de ECD, esta fragmentación realiza una transferencia de electrones de baja energía al ión precursor en fase gaseosa [424]. A diferencia del anterior, puede realizarse en otras trampas de iones diferentes a la ICR. Los fragmentos producidos con este método son del tipo “c-” y “z-” (**Figura 21**), también de intensidad similar y conservando las modificaciones postransduccionales. La ventaja de este método es que proporciona una mayor cobertura de la secuencia proteica en el análisis de péptidos de tamaño pequeño y mediano, por lo que se puede emplear de forma complementaria a la fragmentación de CID para una mejor identificación de las proteínas [425].

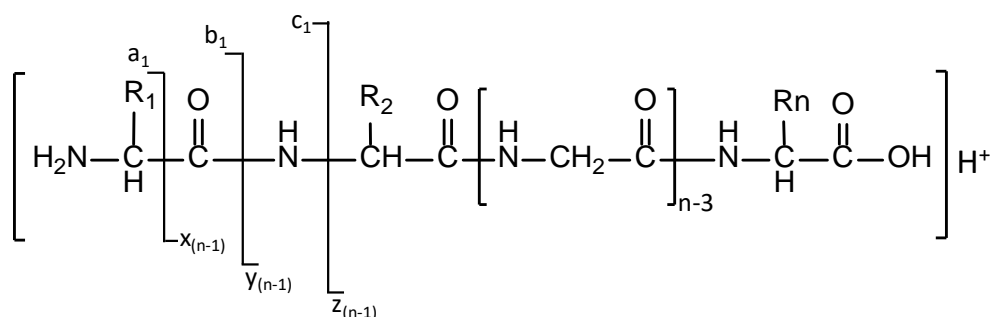


Figura 21. Iones más comunes producidos tras la fragmentación de polipéptidos por MS/MS. Las líneas verticales indican los enlaces que se rompen. Cuando la carga permanece en fragmentos que contienen el extremo N-terminal, los iones se denominan a, b, c, seguido del número correspondiente, comenzando por el aminoácido N-terminal. Cuando la carga permanece en fragmentos que contienen el extremo C-terminal, los iones se denominan x, y, z, seguido del número correspondiente, comenzando por el aminoácido C-terminal [426]

Una vez obtenidos los espectros de MS² correspondientes, se procede a la identificación de las proteínas mediante el empleo de **motores de búsqueda (SEQUEST o Mascot)**, los cuales emplean un algoritmo para la comparación del valor de las masas obtenidas experimentalmente en los espectros MS² con las producidas *in silico*, es decir, teóricamente por el motor de búsqueda. La relación entre la secuencia de amino-ácidos encontrada experimentalmente y la secuencia teórica de la proteína asignada, expresado como porcentaje, se conoce como la **cobertura** de la secuencia de la proteína, y su valor es crucial para determinar el nivel de confianza en la identificación de proteínas realizada.

La identificación de proteínas a través del análisis de las masas exactas obtenidas en los espectros MS² tras la fragmentación de los péptidos procedentes de la digestión enzimática de las mismas es lo que se conoce como **“Peptide Mass Fingerprinting” (PMF)** [427].

Tabla 5. Aplicaciones de espectrometría de masas en tándem para la identificación de proteínas ligadas a fármacos con base de Pt

Acoplamiento	Fármaco de Pt	Biomolécula
ESI-Q-TOF[428]	Cisplatino, transplatino, oxaliplatino	Ubiquitina
ESI-LTQ[197]	Cisplatino, transplatino, carboplatino, oxaliplatino	Citocromo C
ESI-LTQ-FT-ICR[429]	Cisplatino	Citocromo C
ESI-LTQ-FT-ICR[215]	Cisplatino, transplatino	Mioglobina
nESI-Q-TOF[430]	Complejos de Pt (II), <i>cis</i> - y <i>trans</i> -	Metalotioneínas
ESI-FT-ICR[431]	Cisplatino	Chaperona Cop C
ESI-LTQ-FT-ICR[198]	Cisplatino	Ubiquitina
nESI-Q-TOF[92]	Oxaliplatino	Hemoglobina
nESI-Q-TOF[432]	Cisplatino	Metalotioneínas
ESI-FT-ICR[433]	Cisplatino, transplatino, oxaliplatino	Ubiquitina
ESI-LTQ[206]	Cisplatino	HSA, TF, Cit C, CA, Mio

El principal inconveniente de los métodos de identificación de proteínas mediante MS/MS es que el proceso no es de fácil automatización, necesitándose tiempo y experiencia para la correcta interpretación de los espectros MS².

La **Tabla 5** muestra una selección de aplicaciones de espectrometría de masas en tándem para la identificación de proteínas ligadas a Pt.

2.5.4 Identificación de especies ligadas a Pt. El perfil isotópico

Para elucidar la estructura de las biomoléculas analizadas mediante las técnicas de MS moleculares es necesaria una correcta determinación del peso molecular del analito, así como el estudio de la “huella” que supone su perfil isotópico.

En la naturaleza, casi todos los elementos están formados por diferentes mezclas de isótopos presentes en diferentes abundancias, de forma que todos los compuestos serán mezclas de diversas composiciones isotópicas. Debido a la existencia de estas diferentes especies isotópicas, en el espectro de masas de un compuesto no aparece sólo el pico molecular, sino varios picos correspondientes a las diversas composiciones isotópicas del ion molecular. En el caso de las proteínas, las cuales contienen C, H, O, N, S y, en algunos casos, P, la presencia de los diferentes isótopos y abundancias que presentan estos elementos condicionan el perfil isotópico que presentan las proteínas en un espectro de masas. Así, cuanto más grande sea una proteína, presentará un perfil más complejo, alejándose de un único pico monoisotópico predominante.

Además, cuando las proteínas se encuentran coordinadas a un metal con un perfil isotópico característico, como es el caso del Pt (con tres isótopos principales de abundancia similar), sus iones correspondientes en el espectro de masas tendrán un perfil isotópico característico, el cual se verá modificado con respecto al perfil isotópico de la proteína sin coordinar, por contribución de los átomos de Pt presentes en la molécula (**Figura 22**). Esta variación será más acusada cuanta más pequeña sea la molécula original, ya que el perfil isotópico del heteroátomo tendrá mayor contribución.

De esta forma, la presencia de perfiles isotópicos modificados característicos de Pt en el espectro de masas puede servir como indicativo para la identificación de

proteínas coordinadas a este metal [206]. Sin embargo, el inconveniente que presentan los espectros de proteínas modificadas, es que no siempre pueden ser identificadas de forma automatizada con los motores de búsqueda comentados anteriormente, además de ser necesario el empleo de analizadores de alta resolución para que los perfiles isotópicos puedan ser correctamente resueltos y reconocidos.

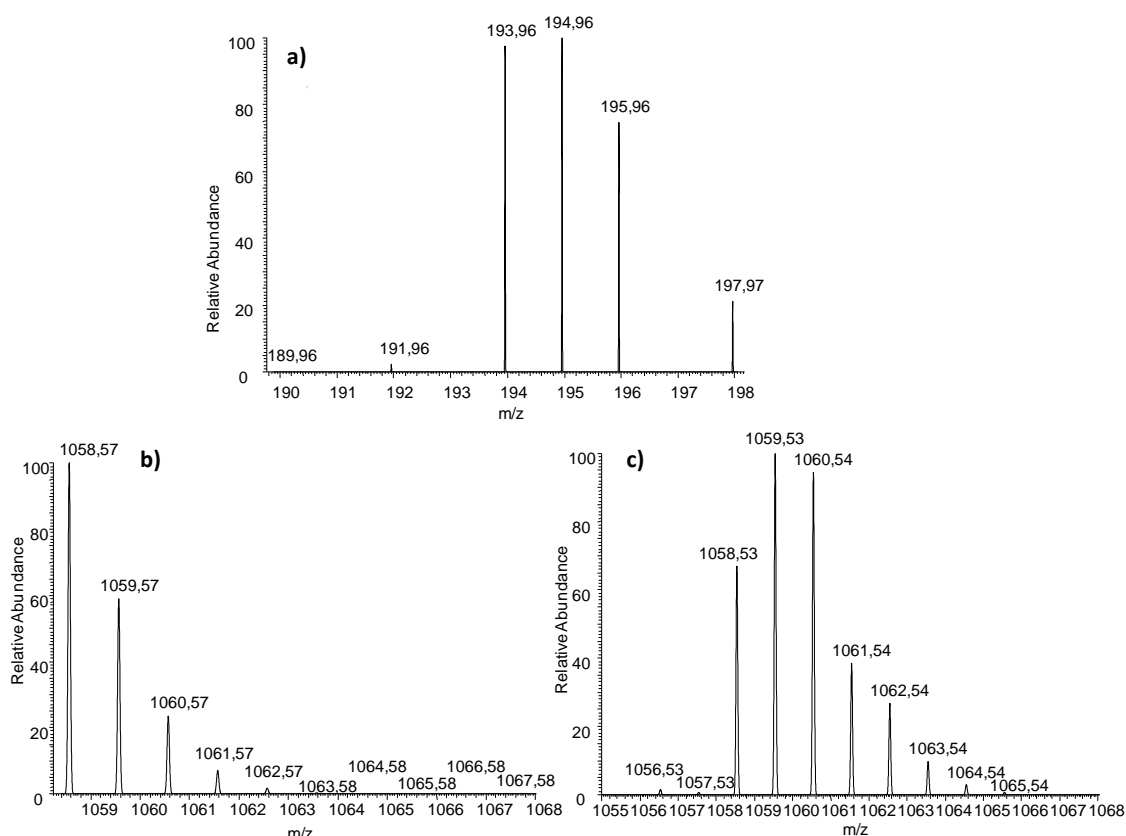


Figura 22. a) perfil isotópico del Pt natural. Perfiles isotópicos para un péptido de masa 1058 b) con composición normal y c) modificado con Pt.

2.6 Acoplamiento de técnicas para la determinación de proteínas ligadas a fármacos de Pt

La especiación de Pt en muestras biológicas puede tener diversos objetivos: el estudio de la estabilidad de los compuestos de Pt en diferentes medios y bajo diferentes condiciones; la investigación de los procesos metabólicos de los fármacos con base de Pt; la monitorización de la administración de fármacos; la caracterización de los aductos Pt-ADN formados, con el fin de conocer los mecanismos de acción de

estos fármacos; o incluso evaluar los efectos provocados por una exposición medioambiental de Pt. Sin embargo, como ha sido comentado anteriormente, el análisis de especiación de metales ligados a biomoléculas en muestras biológicas es una tarea compleja, debido principalmente a la baja concentración del metal, a la complejidad de la matriz, o a la inestabilidad de los complejos formados. Por ello, la correcta elección y acoplamiento de las técnicas de separación, detección e identificación comentadas anteriormente es de suma importancia para poder identificar el mayor número de especies ligadas a Pt [434].

Sin lugar a dudas, el acoplamiento de la cromatografía líquida (en cualquiera de sus modalidades) con la técnica elemental de ICP-MS (HPLC-ICP-MS) es la combinación más empleada en los estudios metalómicos y en la especiación bioinorgánica en general [435]. Una de sus principales ventajas es la facilidad de acoplamiento entre ambas técnicas, que se debe principalmente a la compatibilidad de los nebulizadores empleados en ICP-MS con los caudales empleados habitualmente en HPLC. Sin embargo, existe cierta incompatibilidad con algunas de las fases móviles habitualmente empleadas en HPLC, concretamente las que presentan un alto contenido salino o en disolventes orgánicos. Una concentración salina superior a 50 mM puede producir obturaciones de los conos y del nebulizador. Por otro lado, la presencia de altos contenidos en disolventes orgánicos disminuye la sensibilidad, e incluso se puede producir la extinción del plasma. En el caso del acoplamiento con RPLC, donde se emplean habitualmente disolventes orgánicos para eluir los analitos, la solución instrumental consiste en el empleo de un kit de orgánicos, como ha sido mencionado en el apartado 2.3.2. Alternativamente, el empleo de cromatografía capilar o nano puede ser una solución debido a los bajos caudales empleados, que permiten introducir hasta un 100% del disolvente orgánico sin necesidad de emplear el kit anteriormente mencionado, aunque la sensibilidad puede verse afectada [436]. En este caso, se requiere el empleo de un nebulizador tipo MicroMist, que trabaja a caudales de 0.05 a 0.5 mL min⁻¹. Las columnas más empleadas para la especiación de Pt y sus metabolitos en muestras biológicas son las de intercambio iónico y las de fase inversa. Las primeras han sido empleadas para la separación de las especies iónicas de Pt, mientras que las de fase inversa han sido empleadas en la separación de especies de Pt neutras, con resultados satisfactorios en la separación y determinación de

complejos de Pt en muestras clínicas. En la **Tabla 6** se muestra una selección de aplicaciones para la determinación de proteínas ligadas a fármacos antitumorales de Pt mediante técnicas cromatográficas acopladas.

Tabla 6. Aplicaciones para la identificación de proteínas ligadas a fármacos con base de Pt empleando técnicas cromatográficas acopladas

Acoplamiento	Fármaco de Pt	Biomolécula
SEC-ICP-MS [437]	Cisplatino	GSH, MT
SEC-ICP-MS [438]	Cisplatino	Citosoles de oído y riñón
SEC-ICP-MS [439]	Cisplatino	HSA, TF
SEC-ICP-MS [209]	Cisplatino	Hemoglobina
HILIC-ICP-MS [72]	Cisplatino, carboplatino, oxaliplatino	Suero humano
capRPLC-ICP-MS / capRPLC-ESI-Q-TOF [189]	Cisplatino	HSA, TF
HPLC-ICP-MS / HPLC-ESI-Q-TOF [440]	Cisplatino	Aductos Pt-ADN
RPLC-ESI-Q-TOF [204]	Cisplatino	HSA
nHPLC-ESI-LTQ[206]	Cisplatino	HSA, TF, Cit C, CA, Mio

El acoplamiento de SEC-ICP-MS se ha empleado habitualmente para la simplificación de la muestra y el cribado semicuantitativo de biomoléculas ligadas a metales en muestras biológicas. Con respecto a la separación de complejos proteicos ligados a fármacos con base de Pt, diversos autores han empleado el acoplamiento SEC-ICP-MS en distintas aplicaciones: para el estudio de la formación de complejos entre el cisplatino y GSH o las MTs [437]; para obtener perfiles de Pt en citosoles de células de oído y riñones de ratas tratadas con cisplatino [438]; para estudiar la unión de cisplatino a proteínas del suero sanguíneo como la HSA y la Tf [439]; o para evaluar los complejos formados al incubar cisplatino con hemoglobina [209].

Por otro lado, las fases móviles empleadas en las modalidades RPLC y HILIC las convierten en métodos muy compatibles para su acoplamiento con ESI-MS. En este punto, actualmente existen diferentes interfases comerciales que permiten un fácil acoplamiento de esta técnica de análisis con las modalidades cromatográficas capHPLC y nanoHPLC. Además, el análisis en paralelo mediante HPLC-ICP-MS y HPLC-ESI-MS/MS

resulta de gran utilidad para completar multitud de estudios de metalómica. Por un lado, el primer acoplamiento permite conocer los tiempos de retención para las metaloespecies presentes, las cuales pueden ser identificadas mediante HPLC-ESI-MS/MS. Además, esta combinación permite realizar cierta preconcentración de la muestra empleando precolumnas de RP, lo cual es muy útil en el análisis de muestras biológicas, donde la concentración de metal es muy baja. Respecto a proteínas ligadas a fármacos de Pt, Falta *et al.* cuantificaron cisplatino, carboplatino y oxaliplatino en muestras de suero humano enriquecido con dichos fármacos mediante HILIC-ICP-MS [72]. Empleando el mismo tipo de acoplamiento, Nygren *et al.* también determinaron cisplatino y su metabolito monohidrolizado, empleando la dimetilformamida como disolvente orgánico volátil para disminuir el contenido de disolvente orgánico en el plasma [441]. El acoplamiento en paralelo de capRPLC-ICP-MS y capRPLC-ESI-Q-TOF permitió el análisis de digeridos tripticos de HSA y TF ligados a Pt [189]. García Sar *et al.* también emplearon las técnicas HPLC-ICP-MS y ESI-Q-TOF para la identificación de aductos cisplatino-ADN y su cuantificación por dilución isotópica [440]. Hu *et al.* estudiaron la unión entre cisplatino y albúmina humana recombinante mediante capRPLC-ESI-Q-TOF-MS/MS, encontrando como posibles puntos de unión los residuos Cys 124, His 128 y Met 298, así como los entrecruzamientos producidos por combinación simultánea del fragmento $[\text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{2+}$ entre las His 67 e His 247 [204].

Por otra parte, las técnicas de separación electroforéticas comentadas anteriormente (SDS-PAGE e IEF) también pueden ser acopladas a las técnicas de detección elementales y moleculares aunque, a diferencia de las primeras, el acoplamiento debe realizarse *offline*. Desde que lo propusieran Nielsen *et al.* en 1998 [442], el análisis de las proteínas separadas en el gel suele realizarse mediante la localización previa del metal de interés en los geles mediante LA-ICP-MS. Aunque existen otras técnicas de análisis superficial como XRF o PIXE, este tipo de instrumentación es más costosa, menos sencilla y menos sensible que la anterior, por lo que no se emplean prácticamente [353]. La detección mediante LA-ICP-MS se realiza de diferentes formas dependiendo del tipo de gel. Para geles 1D, suele ablacionarse longitudinalmente todo el carril que contiene la muestra. Sin embargo, en geles 2D puede realizarse de dos formas: ablacionando completamente todo el gel (por lo que no serían necesarias etapas de tinción para la visualización de proteínas, siendo los

tiempos de análisis más largos); o ablacionando de “spot” en “spot”, lo cual requiere una visualización previa de las proteínas mediante tinción. Finalmente, una vez detectada la localización de las proteínas coordinadas a metales, su identificación se llevará a cabo mediante la escisión y digestión de las bandas de gel correspondientes, seguido del análisis de los péptidos resultantes por MS/MS. En el campo de los fármacos antitumorales de Pt, existen muy pocos estudios empleando este tipo de aproximación, ya que pocos laboratorios disponen de este tipo de instrumentación simultáneamente, abordándose la mayor parte de los estudios mediante el acoplamiento de las técnicas cromatográficas y la MS. Mediante el empleo de PAGE, 2D-PAGE, LA-ICP-MS y ESI-MS Khalaila *et al.* detectaron, HSA, TF y α -2-macroglobulinas ligadas a Pt en una muestra de suero incubado con cisplatino [341]. Moreno-Gordaliza *et al.* identificaron mediante LA-ICP-MS y nanoHPLC-ESI-LTQ-FT-MS/MS diversas proteínas procedentes de muestras biológicas (sueros de ratas tratadas con cisplatino, extractos de células RPTECs y proteínas modelo incubadas con el mismo fármaco) las cuales fueron separadas previamente mediante SDS-PAGE en condiciones desnaturalizantes y no reductoras [342]. Por otro lado, Allardyce *et al.* consiguieron identificar la proteína OmpA en una banda con Pt detectada por LA-ICP-MS mediante el empleo de SDS-PAGE en condiciones no reductoras de un extracto de *E. Coli* incubado con cisplatino [212].

Objetivos



OBJETIVOS

Los fármacos con base de Pt cisplatino, carboplatino y oxaliplatino son extensamente empleados como antineoplásticos en diversas dosis, vías de administración y esquemas terapéuticos en pacientes con tumores sólidos. Sin embargo, la presencia de Pt (II) les proporciona la capacidad de unirse (principalmente a través de los grupos tiol) a otras biomoléculas distintas a su diana terapéutica, el ADN, y como resultado con frecuencia se desarrollan fenómenos de resistencia al tratamiento y efectos tóxicos. En el caso del cisplatino, la nefrotoxicidad es el efecto secundario más limitante. El carboplatino y oxaliplatino fueron desarrollados con objeto de disminuir los efectos tóxicos del cisplatino, siendo activos frente al mismo tipo de cánceres y en ocasiones eficaces frente a tumores resistentes al cisplatino. No obstante, presentan otros efectos secundarios como mielosupresión y neuropatías y su eficacia en general es inferior, por lo que el cisplatino se convierte en muchas ocasiones en una opción irremplazable en el tratamiento del cáncer.

A pesar de los numerosos estudios que existen sobre los diferentes mecanismos involucrados en su citotoxicidad, desde sus mecanismos de acción hasta los involucrados en la aparición de fenómenos de resistencia o efectos secundarios, aún existen numerosas incógnitas. En este punto, la Química Analítica puede

proporcionar herramientas de gran utilidad que permitan arrojar cierta luz sobre estos aspectos, sin olvidar el carácter multidisciplinar de los mismos. Así, el desarrollo de estrategias que permitan conocer la distribución de estos fármacos en el organismo, así como sus interacciones con las diferentes biomoléculas del mismo en muestras biológicas es de gran interés.

Por todo ello, el **objetivo principal** de esta tesis doctoral es el **desarrollo de estrategias bioanalíticas basadas en espectrometría de masas atómica y molecular, técnicas de separación electroforéticas en combinación con HPLC y nuevos métodos de preparación de la muestra para la determinación de proteínas ligadas a fármacos con base de Pt en muestras biológicas relacionadas con el fracaso renal, así como para la obtención de mapas de distribución de Pt en tejidos afectados.**

Para desarrollar este objetivo principal se han planteado los siguientes objetivos parciales:

1. Desarrollo de métodos de separación multidimensionales para la separación de proteínas ligadas a Pt, y su aplicación a muestras complejas como fracciones citosólicas de riñones de ratas tratadas con los fármacos antitumorales de Pt.
 - Evaluación de las condiciones de separación más apropiadas para la separación multidimensional de proteínas (2-DE) mediante PAGE y OFFGEL de los complejos Pt-proteína, preservando la estabilidad de dichos complejos.
 - Desarrollo de la metodología analítica necesaria para abordar la digestión enzimática de los complejos de Pt preservando el enlace Pt-proteína.
 - Desarrollo de un procedimiento “*shotgun*” que incluye la separación de péptidos ligados a Pt por OFFGEL-IEF seguido de su separación y análisis mediante nLC-ESI-Orbitrap-MS/MS para la identificación de complejos Pt-proteína.
2. Desarrollo de la metodología analítica necesaria para abordar la caracterización estructural de los complejos Pt-proteína resultantes tras la separación

electróforética multidimensional mediante espectrometría de masas molecular por obtención de un “ión marcador” específico de Pt.

3. Desarrollo de la metodología analítica necesaria para obtener bioimágenes elementales de Pt en tejidos de riñón de ratas tratadas con los fármacos cisplatino, carboplatino y oxaliplatino con el fin de evaluar sus diferentes acumulaciones y distribuciones renales y su relación con sus diferentes comportamientos nefrotóxicos documentados.

- Desarrollo de una estrategia de normalización de la señal obtenida mediante LA-ICP-MS por estandarización interna con impresión que permita comparar las imágenes obtenidas de diferentes tejidos o diferentes sesiones de medida.
- Desarrollo de la metodología analítica necesaria para la obtención de bioimágenes cuantitativas mediante LA-ICP-MS con análisis por dilución isotópica para evaluar la diferente acumulación de los fármacos antitumorales con base de Pt en riñones impactados con los mismos.

Parte Experimental



Capítulo 1. DESARROLLO DE ESTRATEGIAS BIOANALÍTICAS BASADAS EN TÉCNICAS DE SEPARACIÓN MULTIDIMENSIONALES Y ESPECTROMETRÍA DE MASAS ATÓMICA Y MOLECULAR PARA LA DETERMINACIÓN DE PROTEÍNAS LIGADAS A FÁRMACOS CON BASE DE Pt EN MUESTRAS RENALES

PARTE EXPERIMENTAL

1.1. Desarrollo de metodologías de separación multidimensionales para el fraccionamiento de proteínas y péptidos ligadas a Pt en muestras complejas

Como se ha expuesto anteriormente, el cisplatino es el fármaco antitumoral más empleado en el tratamiento de tumores sólidos. La alta eficacia que presenta le hace ineludible en los tratamientos contra el cáncer. Sin embargo, la nefrotoxicidad inducida por este fármaco limita la dosis que puede ser suministrada. Por ello, el estudio de los mecanismos moleculares implicados en el desarrollo de este efecto secundario es de suma importancia. Con el fin de dilucidar los mecanismos de interacción de este fármaco con las proteínas renales, es necesario el desarrollo de estrategias modernas de bioanálisis basadas en el empleo de técnicas de alta sensibilidad de MS: atómica (como ICP-MS) y molecular de ionización blanda (como ESI-MS) que permitan detectar e identificar dichos complejos Pt-proteína.

Debido a la gran complejidad proteica que presentan las muestras reales y la baja concentración de Pt en las mismas, es necesario recurrir a un fraccionamiento previo de la muestra para facilitar la identificación de los complejos Pt-proteína, que se ha realizado mediante métodos de preconcentración y separación multidimensional. Debido a que estudios previos demostraron que los complejos Pt-proteína presentes en muestras complejas no pueden ser separados adecuadamente mediante técnicas cromatográficas bidimensionales, se propuso una alternativa con mayor capacidad de resolución de proteínas como es la electroforesis bidimensional (2-DE) para la

separación de los mismos. Sin embargo, estas técnicas de separación desarrolladas inicialmente para la proteómica clásica, no tienen en cuenta el enlace metal-proteína, por lo que es necesario evaluar la estabilidad de los complejos en las condiciones desnaturalizantes y reductoras empleadas tradicionalmente en dichos métodos.

Esta sección se centra en el uso de agentes reductores sin grupos tiol como alternativa a los reductores tradicionales empleados, y en el desarrollo de una metodología de digestión triptica empleando filtros de corte (FASP), con el fin de mantener la integridad de los complejos Pt-proteína durante los procesos de fraccionamiento de muestra. Dicha metodología fue aplicada a la separación, detección y caracterización de los complejos Pt-proteína que forman los fármacos antitumorales mencionados anteriormente con diferentes proteínas modelo, así como los complejos que forman el cisplatino con proteínas renales de ratas tratadas con este fármaco. Además, como alternativa, se propuso el desarrollo de una metodología “shotgun”, que consiste en el fraccionamiento de la muestra a nivel de péptidos mediante OFGEL-IEF después de la preparación de la misma mediante digestión triptica con filtros de corte (FASP) en condiciones desnaturalizantes y reductoras de los complejos de Pt-proteína.

En primer lugar, en el trabajo 1 (**“OFFGEL isoelectric focusing and polyacrylamide gel electrophoresis separation of platinum-binding proteins”** *Journal of Chromatography A* (2011) 1218, 1281-1290) se evaluó la estabilidad de los complejos Pt-proteína en presencia de los diferentes reactivos empleados en SDS-PAGE y OFFGEL-IEF, así como en los procesos de fijación, tinción de geles y digestión proteica, observándose que la presencia de reactivos con grupos tioles como DTT y tiourea afectan muy negativamente a la estabilidad de los complejos Pt-proteína. En este trabajo, la contribución de la autora de esta Tesis Doctoral fue la evaluación del efecto de los reactivos empleados en la técnica de OFFGEL-IEF en la estabilidad de los complejos Pt-proteína de muestras de proteínas modelo incubadas con cisplatino, así como de los complejos Pt-proteína presentes en muestras citosólicas de riñones de ratas tratadas con dicho fármaco.

En el trabajo 2 (**“Combining TBP-based rOFFGEL-IEF with FASP and nLC-ESI-LTQ-MS/MS for the analysis of cisplatin-binding proteins in rat kidney”** *Talanta* (2014) 120, 433-442) se evaluó la resistencia de los complejos Pt-proteína tras la separación mediante isoelectroenfoque (IEF) en condiciones reductoras con el agente reductor sin grupos tiol tributilfosfina (TBP) en combinación con una digestión trípica empleando filtros de corte (FASP) en condiciones desnaturalizantes y reductoras. Esta metodología fue aplicada tanto a los complejos formados por incubación de proteínas modelo con cisplatino como a los complejos Pt-proteína presentes en la fracción citosólica de muestras de riñón de ratas tratadas con este fármaco. Además se estudió la información estructural de diversos péptidos obtenidos a partir de complejos Pt-albúmina, conduciendo a la localización de diversos sitios de unión del fármaco a la proteína, que fueron analizados considerando la estructura tridimensional de la proteína en base a modelos CPK obtenidos de la base de datos RCSB PDB. Finalmente, los espectros de masas obtenidos tras la aplicación de la metodología descrita a muestras citosólicas de riñón fueron analizados con los motores de búsqueda Sequest y MASCOT proporcionando una lista de proteínas renales ligadas a Pt.

El trabajo 3 (**“Thiol-free reducing agents in electrophoretic separations and FASP proteolytic digestions for the analysis of metal-binding proteins”** *MethodsX* (2014) 1, e175-e180) recoge los protocolos basados en el uso de los agentes reductores sin grupos tioles TBP y TCEP como alternativa a los reductores tradicionales empleados en separaciones SDS-PAGE y OFFGEL-IEF y el empleo de la digestión trípica tipo FASP para el análisis de proteínas renales ligadas a Pt procedentes de la fracción citosólica de riñones de ratas tratadas con los fármacos antitumorales de Pt.

Finalmente, en el trabajo 4 (**“A shotgun approach for the identification of platinum-protein complexes”** *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2015) 407, 2393-2403) se desarrolló una metodología basada en la aproximación “shotgun” que consiste en el fraccionamiento de la muestra a nivel de péptidos mediante OFFGEL-IEF tras haber sido digerida previamente mediante la digestión trípica tipo FASP, con el fin de facilitar la posterior identificación de proteínas ligadas a Pt en muestras biológicas. Esta metodología, junto con el empleo de un espectrómetro de masas tipo LTQ-Orbitrap, fue aplicada a los complejos Pt-proteína procedentes de la incubación de

cinco proteínas modelo con los fármacos cisplatino, carboplatino y oxaliplatino, observándose una mejora en la identificación de péptidos platinados con respecto a los trabajos anteriores.

Trabajo 1

OFFGEL isoelectric focusing and polyacrylamide gel electrophoresis separation of platinum-binding proteins

Journal of Chromatography A 1218 (2011), 1281-1290

Este trabajo fue presentado como Comunicaciones en formato Póster en el congreso internacional “Winter Conference on Plasma Spectrochemistry” celebrado en febrero de 2011 en Zaragoza, España
y en el congreso internacional “Proteomic Forum” celebrado en abril de 2011 en Berlín, Alemania



OFFGEL isoelectric focusing and polyacrylamide gel electrophoresis separation of platinum-binding proteins

M^a Luz Mena, Estefanía Moreno-Gordaliza, Irene Moraleja, Benito Cañas*, M^a Milagros Gómez-Gómez

Analytical Chemistry Department, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 28 September 2010

Received in revised form

26 December 2010

Accepted 30 December 2010

Available online 6 January 2011

Keywords:

OFFGEL-IEF

SDS-PAGE

Platinum-binding proteins

ICP-MS

MALDI-TOF-MS

ABSTRACT

In this work a 2D electrophoretic separation procedure able to maintain the integrity of platinum–protein bonds has been developed. The method is based on the use of sequential OFFGEL isoelectric focussing (IEF) and PAGE. A systematic study of the reagents used for PAGE, for OFFGEL-IEF separation, and post-separation treatment of gels (such as enzymatic digestion and sample preparation for MS analysis) was tackled regarding their suitability for the identification of platinum binding proteins using standard proteins incubated with cisplatin. The distribution of platinum in high and low molecular weight fractions (separated by cut-off filters) was determined by ICP-MS, which allows evaluating platinum–protein bond stability under the conditions studied. SDS-PAGE in the absence of β -mercaptoethanol or dithiotreitol preserved the platinum–protein bonds. In addition, neither the influence of the electric field during the electrophoretic separation, nor the processes of fixing, staining and destaining of proteins in the gel did result in the loss of platinum from platinum binding proteins. SDS-PAGE under non-reducing conditions provides separation of platinum-binding proteins in very narrow bands with quantitative recoveries. Different amounts of platinum-bound proteins covering the range 0.3–2.0 μ g were separated and mineralised for platinum determination, showing good platinum linearity. Limits of detection for a mixture of five standard proteins incubated with cisplatin were between the range of 2.4 and 13.9 pg of platinum, which were satisfactory for their application to biological samples. Regarding OFFGEL-IEF, a denaturing solution without thiourea and without dithiotreitol is recommended. The suitability of the OFFGEL-IEF for the separation of platinum binding proteins of a kidney cytosol was demonstrated.

© 2011 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Platinum-based antitumor drugs (cisplatin ($\text{cis-[Pt(NH}_3)_2\text{Cl}_2]$), carboplatin and oxaliplatin) are widely used for the therapy of various types of cancer (e.g. brain, breast, ovarian, prostate, colon) [1]. Severe side effects (nephrotoxicity, ototoxicity, emetogenesis and neurotoxicity) as well as acquired drug resistance, have often been reported during application of these drugs [2,3]. Only little is known about the molecular principles of these effects. A closer look at the specific binding of platinum to proteins in living organisms [4,5] may shed some light on these mechanisms. However, separation methods have to be developed for the preparation, for structural analysis, of very complex biological samples containing hundreds of proteins that may bind to platinum along with other many non-Pt-bound proteins.

At present, two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) is a powerful separation technique, which allows separation of thousands of proteins in biological research [6,7]. Based on two

distinct procedures, it combines isoelectric focusing (IEF), which separates proteins according to their isoelectric point (pI), and sodium dodecyl sulphate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE), which separates them further according to their molecular mass. The separated proteins in 2-DE gels are visualised by, e.g. Coomassie Blue or silver staining, excised, digested with trypsin and identified by matrix-assisted laser desorption/ionisation-time of flight-mass spectrometry (MALDI-TOF-MS) or by high performance liquid chromatography–electrospray ionisation-mass spectrometry/mass spectrometry (HPLC–ESI-MS/MS) resulting in the principal workflow of the proteomic analysis [8]. Other methodologies may be used for the separation of proteins, but if chromatography is employed, it should be multidimensional involving the use of reverse phase, which may be problematic for the quantitative recovery of a mixture of proteins with broad physical–chemical characteristics. On the other hand, higher resolution can be achieved using capillary electrophoresis but it is not useful for preparative purposes.

It has to be remarked that 2-DE was originally designed for the characterisation of proteins without regard for the trace elements which they may be carrying. However, there is no method for a detailed characterisation of metal–protein complexes in liv-

* Corresponding author. Tel.: +34 913944368; fax: +34 913944329.

E-mail address: bcanasmo@quim.ucm.es (B. Cañas).

ing organisms, and the suitability of these methods will depend strongly on the stability of the metal–protein bond, especially using SDS-PAGE. Because of this, the main problem researchers have to face is that it is not always possible to keep these metal-bound protein complexes intact during separation and post-separation processes, and metal losses may occur. Some authors have already discussed these metal losses in different proteins, and in most cases the use of native- or Blue native-PAGE instead of SDS-PAGE, has been proposed to solve the problem [9–13].

Regarding IEF, fractionation under well-established denaturing conditions (urea, thiourea, DTT, ampholytes and glycerol) has also been widely reported for proteomic studies, including the use of immobilised pH gradient gels (IPG IEF) [14] or solution isoelectric focusing (sIEF) [15], which presents the advantage that the sample is recovered in liquid phase. Commercial sIEF systems can be classified according to the way in which the pH gradient is created, namely, through carrier ampholytes, or through the use of isoelectric membranes, and consequently, to how proteins are confined within the gradient. In the case of Agilent's OFFGEL system [16,17], which has been used for the experiments described in the present work, the pH gradient is formed through isoelectric membranes. The OFFGEL system presents the capability of generating stable pH gradients, an effective barrier between successive chambers and superior focusing to those employing carrier ampholytes.

In contrast, there are very few reports on native IEF. Shang et al. [18] successfully performed native IEF on myoglobin and yeast soluble proteins. However, the applicability of this approach to the study of metalloproteome has not been fully investigated. Recently, Pioselli et al. [19] separated mixtures of metalloproteins containing copper, zinc and iron by sIEF with a five-well system under well-established denaturing, and novel non-denaturing separation conditions. Denaturing conditions separate the metalloprotein mixtures with high resolution, although the stability of the complexes was affected. However, non-denaturing conditions showed a lower degree of resolution in the separation, but the stability of the metal–protein complexes was preserved.

The analytical approaches for platinum binding proteins have been recently reviewed by Esteban-Fernández et al. [20]. The use of native 2-DE has been reported by Lustig et al. [21,22] for the separation of human and rabbit serum incubated with PtCl_4^{2-} . They concluded that platinum binds very strongly to various serum proteins such as albumin, transferrin and globulin and the binding seems to be strong enough to withstand the electric field, the IEF and the native-PAGE. Moreover, Ma et al. [23] also studied platinum-binding serum proteins after native-PAGE, obtaining representative platinum signals for these proteins. However, for complex samples, SDS-PAGE is preferred due to its higher resolution and reproducibility.

The stability and the strength of the platinum–protein bond in the presence of chemicals, such as urea, 3-[(3-cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate (CHAPS), dithiotreitol (DTT) and SDS have been evaluated by several authors [22,24,25]. Lustig et al. [22] demonstrated, for rabbit serum incubated with PtCl_4^{2-} , the possibility of using urea, even at high concentrations (9 M), and SDS only at concentrations lower than 0.1%, while CHAPS and DTT could not be used at all. However, recently Moreno-Gordaliza et al. [24] demonstrated that the platinum–protein bonds in an insulin-cisplatin model resisted the action of the denaturing and reducing agents (such as urea 8 M and DTT 10 mM) in a Tris buffer, remarking the significant strength of the platinum–protein bonds. Esteban-Fernández et al. [25] also studied the stability and strength of the bond by subjecting the cytosolic fraction of kidney and ear impacted by cisplatin to several treatments common in gel electrophoresis, employing SDS, β -mercaptoethanol (BME), heating and sonication. Analysis by size exclusion chromatography–inductively coupled plasma–mass

spectrometry (SEC–ICP–MS) revealed that biomolecule–cisplatin interactions resisted denaturing and reducing conditions, based on the absence of the peak corresponding to free cisplatin in the treated samples and in the non-significant differences in the chromatographic profiles for treated and untreated samples.

Indeed, gel electrophoresis has already been successfully applied for the separation of cisplatin-containing proteins in biological samples. In particular, Allardye et al. [26] administered cisplatin to *Escherichia coli* cells, and proteins were partially separated by non-reducing SDS-PAGE, followed by a platinum analysis by laser ablation (LA)–ICP–MS. Membrane proteins were identified in a platinum-rich electrophoretic band by reversed phase-electrospray ionisation–time of flight (RP-ESI-Q-TOF), after an in-gel tryptic digestion. In this case, the outer membrane protein A (ompA) was identified and was proposed to be involved in the cellular cisplatin intake.

On the other hand, not only the nature of the electrophoretic (native or SDS) process may alter the metal–protein binding. There are few studies regarding the influence of other extra-electrophoretic conditions (including post-separation process) on possible metal–protein binding break. Using synchrotron radiation X-ray fluorescence as detection system after SDS-PAGE, Gao et al. [27] found that not only the influence of the electric field during electrophoresis separation, but also the processes of fixing, staining and destaining of proteins in the gel may result in loss of metal ions (such as Cu, Fe and Zn) from metalloproteins in human liver cytosol. Recently, Raab et al. [28] found that staining of the gel prior to LA-ICP–MS is not recommended, since most of the protein-bound metal is lost during the staining procedure (except when it is covalently bound), and should be avoided prior to ablation. They also found that native gel electrophoresis is the most suitable technique to separate metal–protein complexes and preparation for metal detection and quantification by LA-ICP–MS.

The aim of this study is to determine the most appropriate separation conditions for 2-DE based on the sequential use of PAGE and OFFGEL-IEF of proteins containing platinum, and to define general parameters for post-separation treatments to make the proteins suitable for structural MS analysis, preserving the platinum–protein bonds along the whole analytical procedure. The location and quantification of platinum in the gel or in the wells after OFFGEL-IEF separation of a mixture of standard proteins incubated with cisplatin, may allow evaluating platinum–protein bond stability under the conditions needed for both separation techniques. To quantify the platinum remaining bound to the protein after 2-DE and to evaluate the origin of possible platinum losses, a model protein, HSA, was incubated with cis-Pt and subjected to each of the procedures implicated in these separations. After the incubation of the HSA–Pt complexes with the different reagents used in PAGE, or in OFFGEL-IEF, or in post-separation treatments, solutions were subjected to ultrafiltration through 3 kDa cut-off filters and platinum was measured by ICP–MS. In addition, the isoelectric fractionation of a kidney tissue extract from a rat treated with cis-Pt was performed to study the recovery of protein-bound Pt under the optimal conditions investigated.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

The platinum-based drug used was cisplatin (Sigma Aldrich Chemie, St. Louis, MO). Human apo-transferrin (TF), human serum albumin (HSA), carbonic anhydrase from bovine erythrocytes (CA), myoglobin from horse heart (MYO) and cytochrome c from horse heart (CYT C) were also purchased from Sigma Aldrich. Sodium chloride (Panreac Química, SA, Barcelona, Spain) and 2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol Tris (Sigma Aldrich Chemie, St.

Table 1

Recoveries for HSA-cisPt expressed as percentage of platinum, after ultrafiltration, mixed 1 + 1 with the different reagents given in the table tested under: A) non-denaturing or denaturing and/or reducing PAGE, B) OFFGEL-IEF or C) during in gel digestion with trypsin. In all the cases, the relative standard deviation is lower than 3% for three determinations.

Reagents	Reaction time (min)	Protein-bound Pt (%)	Non-protein-bound Pt (%)
A. Reagents used under non-denaturing or denaturing PAGE			
(A1) Native buffer ^a	5	94	6
(A2) LSB ^b	5	98	2
(A3) LSB	60	88	12
(A4) LSB (95 °C)	5	98	2
(A5) LSB (95 °C)	60	91	9
(A6) BME (5%)	5	92	8
(A7) BME (5%)	24 h	80	20
(A8) LSB with BME	5	91	9
(A9) LSB with BME	60	65	35
(A10) LSB with BME (95 °C)	1	87	13
(A11) LSB with BME (95 °C)	5	64	36
(A12) LSB with BME (95 °C)	60	41	59
(A13) LSB with DTT	5	96	4
(A14) LSB with DTT (95 °C)	1	95	5
(A15) Running buffer ^c	60	100	0
(A16) Bio-Safe™ Coomassie stain	60	92	8
(A17) Fixing solution	60	98	2
B. Reagents used under OFFGEL-IEF			
(B1) Thiourea (2.5 M)	5	57	43
(B2) Thiourea (2.5 M)	24 h	61	39
(B3) DTT (5%)	5	87	13
(B4) DTT (5%)	24 h	85	15
(B5) Denaturing solution (DS) ^d	16 h	57	43
(B6) DS without DTT	24 h	68	34
(B7) DS without thiourea	24 h	79	23
(B8) DS without thiourea and DTT	24 h	98	2
C. Reagents used during in gel digestion with trypsin			
(C1) NH ₄ HCO ₃ (50 mM, 22 °C)	60	99	1
(C2) NH ₄ HCO ₃ (25 mM, 22 °C)	60	99	1
(C3) NH ₄ HCO ₃ (25 mM, 37 °C)	16 h	93	7
(C4) Tris-HCl pH 7.8 (25 mM, 37 °C)	16 h	94	6
(C5) Formic acid 5%	60	98	2

^a Composition of Native buffer (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, glycerol 40%, bromophenol blue 0.01%).

^b Composition of Laemmli sample buffer (Tris-HCl 62.5 mM pH 6.8, glycerol 25%, SDS 2%, bromophenol blue 0.01%).

^c Composition of running buffer (Tris-HCl 25 mM pH 8.3, glycine 192 mM, SDS 0.1%).

^d Composition of denaturing solution (DS): urea 8 M, thiourea 2.5 M, DTT 0.08 M, ampholytes and glycerol.

Louis, MO) were used for the preparation of the incubation solution under physiological conditions.

High-purity HNO₃, used both for the pH adjustment of the previously mentioned incubation media and for the mineralisation of the electrophoretic gels, and HCl were obtained by distillation of the analytical-grade reagents (Merck, Darmstadt, Germany) in an acid distiller (Berghof B BSB-939IR, Eningen, Germany). Hydrogen peroxide (30%, w/v, Panreac Química SA, Barcelona, Spain) was used for sample digestion. Stock solutions of platinum and iridium (1000 mg L⁻¹, Merck, Darmstadt, Germany) were diluted with HCl (0.24 mol L⁻¹) to prepare ICP-MS standard solutions. Working solutions were prepared daily and diluted with HCl (0.24 mol L⁻¹) to final concentration. All solutions were prepared with deionised water (Milli-Q Ultra pure water systems, Millipore, USA).

2.2. In vitro incubations and protein quantification

To reproduce the physiological intracellular saline and pH conditions, TF, HSA, CA, MYO and CYT C (62 μM) were incubated, separately, with cisplatin (620 μM) at a molar ratio 1:10 in a buffer containing NaCl (4.64 mM) and Tris-NO₃ (10 mM, pH 7.4) at 37 °C in a thermostatic bath (Neslab RTE-111). Control samples were also prepared by incubating the same proteins under the same conditions already described but in the absence of cisplatin. To remove free cisplatin, samples were filtered through a Amicon Ultra-0.5 mL Ultracel-3 (3 kDa cut-off filter, Millipore) by centrifugation at 14,000 × g during 30 min, reversing the filter and recovering the retained fraction containing cisplatin-bound

proteins by centrifugation at 1000 × g for 2 min. Both fractions (retained and non-retained) were analysed by ICP-MS.

Total protein concentration in the solutions was determined by the Quick Start Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). The kit supplied Bradford reagent in a solution containing methanol and phosphoric acid and the standard proteins in NaCl (0.9%) and NaN₃ (0.05%). Bovine serum albumin (BSA) at seven different concentrations: 2, 1.5, 1.0, 0.75, 0.5, 0.25 and 0.125 mg mL⁻¹ were used as standards for quantification. The 1 × dye reagent was added to each standard and to the sample solutions, vortexed and incubated at room temperature for at least 5 min. The assay was performed in 2.0 mL disposable plastic cuvettes and the absorbance measured at 595 nm in an HP8453 UV-visible spectrophotometer (Agilent Technologies Inc., Waldbronn, Germany). The linear range obtained for BSA was 125–1000 μg mL⁻¹.

2.3. Stability of the platinum–protein adducts

Aliquots of 250 μL of the retained fraction on the cut-off filter for HSA incubated with cisplatin, which was prepared as described in Section 2.2, were mixed with 250 μL of the different reagents used under non-denaturing or denaturing PAGE, OFFGEL-IEF or digestion with trypsin, as shown in Table 1. After these treatments, samples were ultrafiltrated again and the retained and filtrated solutions were analysed for total Pt content determination by ICP-MS.

Firstly, it was studied if platinum–protein bonds are stable under incubation with the different chemical compounds used in PAGE,

either, in non-denaturing (Native buffer, A1 in Table 1) or in reducing and denaturing conditions (LSB containing 2% SDS together with 5% BME heated at 95 °C for 5 min, A11). As a comparison, LSB was also tested in milder conditions: non-reducing, without BME, at 25 or 95 °C (A2 and A4, respectively), reducing (with BME) at low temperatures, 25 °C (A8) or even replacing BME by 0.08 M DTT at 25 or 95 °C (A13 and A14, respectively). Incubations were made trying to emulate the time needed for the separation of proteins by SDS-PAGE (between 5 and 60 min for samples A3, A5, A9 and A12). Moreover, the influence of BME alone was also studied for longer reaction times: 5 min or 24 h (A6 and A7). Other reagents and incubation times studied were: running buffer, for 1 h (A15), Bio-Safe™ colloidal Coomassie Blue G-250 stain, for 1 h (A16) or H₂O/methanol/acetic acid (72.5/20/7.5), which is used for protein fixation to the gel prior to staining, for 1 h (A17).

On the other hand, it was also studied if the Pt bound to HSA was preserved after treatment with the reagents typically involved in OFFGEL-IEF separations. Either 2.5 M thiourea or 80 mM DTT alone was tested separately at different reaction times: 5 min and 24 h (B1, B2, B3 and B4, respectively in Table 1), as well as a denaturing solution containing 2.5 M thiourea, 80 mM DTT, 8 M urea, ampholytes and glycerol for 16 h (DS) (B5). Moreover, the effect of thiourea (B6), DTT (B7) or both DTT and thiourea (B8) in the denaturing solution was also evaluated.

Finally, in order to study the influence of the reagents used in the post-separation treatments of gels (such as enzymatic digestion and sample preparation for MS analysis), the protein bound platinum fraction (i.e. >3 kDa) was also diluted 1 + 1 with NH₄HCO₃ at different concentrations, temperatures and for different reaction times: 50 mM at 22 °C, shaking for 60 min (C1 in Table 1), 25 mM at 22 °C, shaking for 60 min (C2), 25 mM at 37 °C, shaking for 16 h (C3), Tris-HCl pH 7.8 (25 mM, 37 °C, shaking at 300 rpm for 16 h) (C4) or 5% formic acid (C5).

Total protein concentration in the solutions was also determined by the Quick Start Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA), as described above in Section 2.2. In all the cases studied, approximately 95% of the total protein content was recovered in the fraction higher than 3 kDa, finding no protein traces in the fraction below 3 kDa.

2.4. PAGE separation

PAGE was carried out with a Mini Protean Tetra Cell Electrophoresis System (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) using 3 and 12.5% of polyacrylamide for the stacking and the resolving gels, respectively.

For denaturing and reducing conditions, 5% (710 mM) of the reducing agent (BME) was added to the Bio-Rad's Laemmli sample buffer (LSB), containing Tris-HCl (62.5 mM, pH 6.8), glycerol (25%), SDS (2%) and bromophenol blue (0.01%) (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). Samples were diluted 1 + 1 with the above mixture, and heated for 5 min at 95 °C. For SDS-PAGE separations under non-reducing conditions, samples were diluted with LSB containing the same reagents, in the absence of BME, instead. The gels were run at constant current (12 mA for 20 min and 20 mA for 3 h).

Precision Plus Protein standards, unstained (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA), were used to provide a ladder of convenient and consistent molecular sizes. It contained 10 recombinant protein bands of 10, 15, 20, 25, 37, 50, 75, 100, 150 and 250 kDa. They were provided in the loading buffer (which contained glycerol (30% w/v), SDS (2%), Tris (62.5 mM, pH 6.8), DTT (50 mM), EDTA (5 mM), sodium azide (NaN₃, 0.02%) and bromophenol blue (0.01%), ready to load, with no dilution required for its application. The running buffer contained Tris-HCl (25 mM, pH 8.3), glycine (192 mM) and SDS (0.1%).

After separation, gels were washed in deionised water for 20 min and the proteins fixed on the gel for 1 h in a solution containing H₂O/methanol/acetic acid (72.5/20/7.5). Gels were visualized by staining with (a) Bio-Safe™ colloidal Coomassie Blue G-250 (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA) for 1 h or (b) Dodeca Silver Stain kit (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA).

2.5. Gel mineralisation for platinum analysis by ICP-MS

Gels were cut into pieces, which were digested in mini-Teflon vessels with 1.0 mL of HNO₃ and 0.5 mL of H₂O₂ and evaporated to dryness. Two more evaporation steps were performed, adding 1.0 mL of aqua regia and then 1.0 mL of HCl. Finally, the samples were diluted to 2.0 mL with HCl 0.24 M for ICP-MS analysis.

A Quadrupole ICP-MS Thermo X-series (Thermo Electron, Windford, Cheshire, UK) equipped with a Meinhard nebuliser, a Fassel torch, and an Impact Bead Quartz spray chamber cooled by a Peltier system was employed for total platinum determination. ICP-MS operating conditions were: forward power, 1250 W; plasma gas, 15 L min⁻¹; auxiliary gas, 0.73 L min⁻¹; nebuliser gas, 0.85 L min⁻¹; channels per AMU, 10; and integration time, 0.6 ms. Platinum content measurements were acquired in continuous mode, monitoring *m/z* 194 (Pt), 195 (Pt), and 191 (Ir). Non-spectral interferences (matrix effects) were not observed; thus, quantification of platinum was carried out by external calibration over the working range (0.5–100 µg L⁻¹) with 20 µg L⁻¹ iridium as internal standard (IS).

2.6. OFFGEL-IEF

2.6.1. Sample preparation

About 0.250 g of kidney tissue from a rat which was treated with a monodose of 16 mg of cisplatin per m² of corporal surface and sacrificed three days after the treatment, as already described by Esteban-Fernández et al. [25], was dissected and homogenised in a Potter with 3 mL of a buffer containing Tris-HCl (10 mM), NaCl (25 mM) and 12.5 µL of a protease inhibitor cocktail. The homogenates were centrifuged at 15,000 × *g* for 40 min. All the preparative steps were performed at 4 °C to minimise the risk of species degradation or transformation. Then, protein precipitation was performed by adding six volumes of acetone (80% at –20 °C) to one volume of the cytosolic fraction (4.5 mg total protein content) to a final volume of 2.0 mL incubating the mixture overnight at –20 °C. Next, the mixture was centrifuged at 13,000 × *g* for 10 min and the supernatant was carefully removed and discarded. The pellet was then washed with a small amount of acetone, centrifuged and the supernatant was again discarded.

2.6.2. OFFGEL electrophoresis

For the pI-based protein separation, the 3100 OFFGEL Kit pH 3–10 (Agilent Technologies Inc., Waldbron, Germany) with a 12 or 24-well setup was used according to the protocol of the supplier. Ten minutes prior to sample loading, 24-cm-long IPG gel strips with a linear pH gradient ranging from 3 to 10 were rehydrated in the assembled device with 40 µL of focusing buffer (either urea 8 M, thiourea 2.5 M, DTT 0.08 M, ampholyte and glycerol, or urea 8 M, DTT 0.08 M, ampholyte and glycerol) per well. The pellet from the cytosolic fraction (4.5 mg total protein content) or the mixture of standard proteins (625 µg total protein content) was diluted with focusing buffer to a final volume of 3.6 mL, and 150 µL of sample was loaded in each well. The sample was then focused with a maximum current of 50 µA, and typical voltages ranging from 500 to 4000 V until 50 kV h was reached after 24 h. The recovered fractions (volumes between 100 and 150 µL) were diluted to 1.5 mL with distilled water for ICP-MS analysis.

2.7. In-gel tryptic digestion of proteins separated by SDS-PAGE and analysis by MALDI-TOF-MS

When protein identification was needed, *in situ* digestion with trypsin was performed after gel separation, the produced peptides were extracted and identification was obtained by peptide mass fingerprinting (PMF) following the protocols described elsewhere [8]. In brief, gel slices were washed for at least 1 h in 500 μ L of 50 mM ammonium bicarbonate (NH_4HCO_3) at 22 °C, with shaking (1000 rpm) in a Thermomixer (Eppendorf AG, 22331 Hamburg, Germany). Then, the solvent was discarded and the gel slices were washed in 500 μ L of acetonitrile/ NH_4HCO_3 (50% / 50 mM) with shaking (1000 rpm) for 1 h. Again, the wash off was discarded; each slice was cut into 2–3 pieces and transferred to a 200 μ L Eppendorf-like PCR tube. The gel slices were kept wet with the wash solution to facilitate cutting and transfer. Next, 50 μ L acetonitrile was added to shrink the gel pieces. After 10–15 min, the solvent was removed and the gel slices were dried in the Concentrator Plus (Eppendorf AG, 22331 Hamburg, Germany). Finally, the gel pieces were reswelled with 40 μ L of 50 mM NH_4HCO_3 containing 12.5 ng μL^{-1} modified porcine trypsin (Promega, Madison, WI, USA). Once the gels had been completely reswollen, 10–20 μ L of 50 mM NH_4HCO_3 was added to cover the gel pieces and incubated overnight at 37 °C.

A MALDI-TOF mass spectrometer (Voyager DE-PRO, Applied Biosystems) was used to analyse protein digests. The instrumental parameters were set as follows: detector, reflectron mode; accelerating voltage, 20 kV; grid, 75%; guide wire, 0.002; delay time, 100 ns. Acquisition was made in the m/z range 800–4000. A total of 100 shots were performed per spectrum, and six spectra were accumulated per sample in order to increase the S/N ratio. Spectra were acquired in the positive ion mode.

Samples for MALDI-TOF-MS analysis were prepared following the dried droplet method. A volume of 0.5 μ L of the prepared digest was mixed with 0.5 μ L of a saturated solution of α -cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile and 0.1% trifluoroacetic acid as matrix. The mixture was deposited into a stainless steel MALDI sample target and air-dried. Calibration was performed externally using the monoisotopic masses of the singly charged ions produced by the peptide standards bradikinin 1–7 (757.3997), angiotensin II (1046.5423), P14R (1533.8582) and ACTH 18–39 (2465.1989). The peaks from porcine trypsin at 841.50 and 2210.10 were used for internal mass calibration. Peptide mass fingerprinting was performed searching protein databases with either Mascot (Matrix Science, London, UK), or ProFound (Proteometrics, New York, USA) search engines. Peptide mass tolerance was set to 100 ppm, allowing two missed cleavages per peptide. Methionine oxidation was considered as variable modification. All the searches were performed without constraining proteins molecular weight (Mr) and pI, and without any taxonomic specifications. Positive identifications were considered according to the statistics of the program used, being the assignments manually checked as well.

3. Results and discussion

A systematic study on the reagents used for PAGE, for OFFGEL-IEF separation, or for post-separation treatments of gels, such as enzymatic digestion and sample preparation for MS analysis, was tackled regarding their suitability for the identification of platinum binding proteins. As a pre-screening step, incubated HSA–cisPt, chosen as a model protein, was subjected to treatment with those reagents involved in the mentioned methodologies, in order to check the degree of remaining protein-bound Pt. The preservation of Pt–protein bonds was also checked after the separation of a mixture of Pt-binding proteins by either PAGE or OFFGEL-IEF. The latter was also applied for the separation of a rat kidney extract containing Pt–proteins.

3.1. PAGE separation

3.1.1. Study of the stability of platinum–protein bonds

The stability of Pt–protein bonds after treatment with the reagents used for PAGE in non-denaturing, non-reducing, or in reducing and denaturing conditions, was studied using a HSA–Pt model, as described in Section 2.3.

Table 1A shows the percentage of Pt found in the retained and filtered fractions, calculated over the total Pt content measured in both fractions, being the protein losses, due to unspecific adsorption to the filters, around 5% for all the samples. As can be seen, sample preparation for native-PAGE, provides a high platinum content in the fraction higher than 3 kDa (94%), indicating that the platinum-bound protein was stable after the incubation in these mild conditions, avoiding buffer systems with platinophile N- or S-donor groups. However, traditional sample preparation for SDS-PAGE (A11) produced a lower recovery (64%) of platinum bound to protein, which decreased (41%) when heating for a longer period of time (60 min). Nevertheless, the recovery after heating for only 1 min was acceptable (87%). To evaluate which of the reagents used in these conditions was the origin of the platinum losses, BME alone was tested for different reaction times, 5 min and 24 h, without heating (A6 and A7, respectively). It can be seen that the recovery after 5 min of incubation was acceptable, but relatively high platinum losses were obtained for a longer reaction time (80% recovery). On the other hand, recoveries obtained under sample preparation conditions for SDS-PAGE using DTT instead of BME were very similar, either at room temperature, for 5 min: 96 (A13) vs. 91% (A8) or at 95 °C for 1 min: 87 (A10) vs. 95% (A14). Consequently, it may be concluded that the presence of a reducing agent with thiol groups (BME or DTT) at high temperatures or during long incubation times (60 min, A9 and A12) produces deleterious effects in the binding between platinum and proteins. Results also indicate that the presence of SDS at concentrations up to 1% does not affect platinum–protein bonds, even after incubation at high temperatures (A2 and A4), being the platinum recoveries in the low molecular weight fraction the lowest as compared to all the conditions studied: 2%. Moreover, Table 1A also shows that the exposure of the HSA–platinum complex for 1 h to a fixing solution and to Bio-Safe™ colloidal Coomassie Blue G-250 stain (containing less than 5% v/v phosphoric acid) resulted in a platinum loss of approximately 2% and 8%, respectively. These results demonstrate that methanol and phosphoric acid contained in the fixing solution did not significantly disrupt platinum–HSA bonds, and it is possible to stain the gel prior to MS analysis. Unsuccessful results were elsewhere reported for Fe-, Cu- and Zn-protein complexes that suffer a loss of up to 90% protein-bound metal during the staining procedure [28], indicating that the study of metalloproteins by SDS-PAGE when the metal is not covalently bound is more problematic and technically demanding.

As a result of that, it is possible to conclude that native- or SDS-PAGE in the absence of BME or DTT (A2 conditions given in Table 1A) may be appropriate to separate platinum-containing proteins. Moreover, after PAGE separation, the use of methanol/acetic acid for fixing and Colloidal Coomassie blue for staining is recommended, because these reagents do not alter the native platinum species by stripping the metal off the protein.

3.1.2. Quantification of platinum in protein bands after PAGE separation

A method was developed to follow up the separation of the Pt–protein bands after PAGE separation and for the quantification through the gel of the platinum which remained bound to the proteins. This methodology is needed for a further evaluation of the stability of platinum–protein bonds in a mixture of proteins separated by SDS-PAGE. 10 μ g of either HSA or HSA–cisPt (fraction

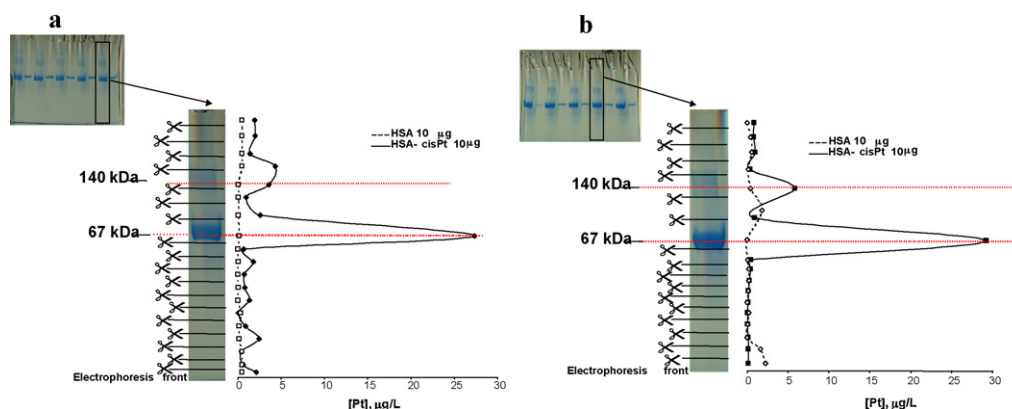


Fig. 1. Platinum profile obtained for a stained gel containing HSA or HSA-cisPt after treatment with: (a) LSB with 5% BME, or (b) LSB with 5% BME heated at 95 °C for 5 min. The stained gel was cut in 19 pieces. Left side: photo of the gel, molecular weight of standard proteins and cut areas.

higher than 3 kDa) were subjected to SDS-PAGE, using LSB with 5% BME, without heating the sample. After fixing the gel, HSA or HSA-cisPt detection was achieved using Bio-Safe™ colloidal Coomassie Blue G-250 stain. Then, several gel lanes were selected to study the distribution of platinum across their total length. Selected lanes were cut into 19 pieces, which were mineralised (see Section 2.5 for full details) and solutions obtained were diluted to 2.0 mL with HCl 0.24 M. Finally, the platinum contained in each of the gel pieces was determined by ICP-MS.

Fig. 1a shows the distribution of platinum through the 19 pieces of the gel showing the highest ICP-MS signal for platinum located on a small area corresponding to the stained area containing the protein (indicated by a red dotted line). This profile proves, first, that platinum is found in the expected band, bound to HSA, and second, that no platinum is lost during the separation since no platinum is detected at the front, where low molecular mass products are expected. Fig. 1a also shows a band containing only HSA (black dotted line), which is used as a control lane. It can be seen the total absence of platinum on the stained area as well as in the rest of the gel lane. Results confirm a reduced platinum background due to the platinum electrodes because in vertical gel electrophoresis the gel comes into very little contact with the electrodes, usually thin platinum wire. It is also important to remark that no contamination was observed due to the several steps involved in the mineralisation of the gel pieces.

Experiments were conducted to reduce the time needed for mineralisation of the gel lanes; thus, only two evaporation steps were performed, excluding the evaporation with aqua regia. Results show that although platinum distribution is the same as that with aqua regia, the response found was lower (data not shown). Therefore, for the rest of the work, mineralisation was carried out following the three evaporation steps described in Section 2.5.

The platinum data for HSA-cisPt was expressed as a percentage of the total platinum introduced in the gel lane, which is measured directly by ICP-MS, showing a recovery of 78%. This recovery is lower than the value given in Table 1 (91%), probably due to the influence of the reaction time for platinum–protein samples containing BME. However, it is important to remark the presence of most of the Pt bound to the protein even in denaturing and reducing separation conditions. This fact is very important for the analysis of platinum in biological samples where the use of these conditions may be needed.

The distribution of platinum through the gel lanes when the loaded samples, containing either 10 µg of HSA or HSA-cisPt, were previously incubated at 95 °C for 5 min with LSB containing BME was also studied. Results shown in Fig. 1b confirm the previous platinum distribution, even in the conditions in which part of the

platinum had been removed from the protein. Platinum was always absent in the lanes loaded only with HSA, as there were no traces over the blank level either in the HSA band, or in the rest of the lane. The platinum data for HSA-cisPt expressed as a percentage of the total platinum loaded in the gel lane, which was also measured directly by ICP-MS, showed a recovery of 71%. This recovery is in accordance with the values given in Table 1A (64%). Moreover, in all the lanes loaded with HSA-cisPt, a less intense upper platinum-containing band is observed. This band is due to HSA dimerisation. Results are in agreement with those reported by Ivanov et al. [29], who described, using SEC-UV, that cisplatin leads to HSA dimerisation, detecting platinum-species of around 140 kDa.

3.1.3. Evaluation of the Pt–protein bonds stability in a mixture of proteins under denaturing or denaturing and reducing PAGE

Mixtures of proteins (TF, HSA, CA, MYO and CYT C) which had been incubated separately in the absence or presence of cisPt were employed to evaluate the metal–protein bond stability under SDS-PAGE separations, using 0.3, 0.5, 1.0 and 2.0 µg of each protein. Coomassie-stained gels corresponding to the separation of the proteins by either non-reducing SDS-PAGE or reducing SDS-PAGE (using LSB with BME heated at 95 °C for 5 min) are shown in Fig. 2a and b, respectively. Moreover, Fig. 2c and d shows the platinum distribution of the selected area in Fig. 2a and b (black dotted line), respectively. As can be seen, stained proteins showed a similar protein distribution in both cases, independently on the conditions used. However, better resolution was achieved by using reducing and denaturing conditions (Fig. 2b). Estimated molecular weights of the proteins were ~76, ~67, ~29, ~17 and ~12 kDa, which were in agreement with the theoretical Mr values of TF, HSA, CA, MYO and CYT C. Moreover, it was observed that in all the lanes less intense bands appeared, corresponding to protein dimerisation (as was previously reported for HSA).

To determine the amount of platinum remaining bound to proteins under the different PAGE separation conditions, the lanes corresponding to protein bands (2 µg), which are indicated by a dotted black line, were cut in 19 pieces. The different pieces were mineralised and the platinum content was determined by ICP-MS. The platinum profiles are shown in Fig. 2c and d. As can be seen in Fig. 2a and b, the electrophoretic resolution under the described conditions allows differentiating sharp Coomassie-stained protein bands. The platinum profiles, shown in Fig. 2c and d, for these gels, seem to have less resolution, but this is an artifact as for these measurements, lanes were not cut in tiny bands; the goal was only to show that the platinum was still bound to protein bands and only to these bands. In all the cases, a big peak can be discerned, at a mass around 150 kDa, which corresponds to the TF and HSA

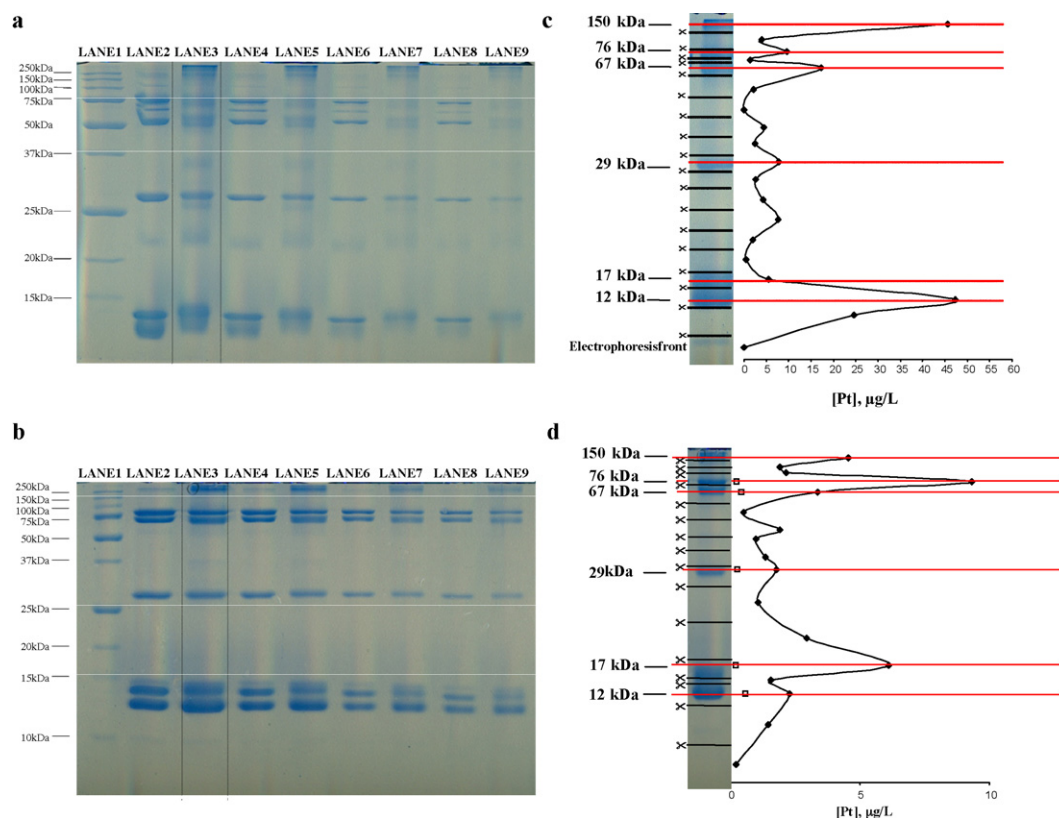


Fig. 2. Separation of a mixture of standard proteins (TF, HSA, CA, MYO and CYT C) under different PAGE conditions: (a) denaturing and (b) denaturing and reducing. (c and d) The platinum distribution of the selected area in (a) and (b), respectively. (d) White squares, which correspond to the platinum content found in the gel loaded with the same mixture of proteins, but without cisplatin. Left side of (a), (b): molecular weight of standard proteins. In (a) and (b), Lane 1: Precision Plus Protein standards; Lanes 2, 4, 6 and 8: differing amounts (2, 1, 0.5 and 0.3 μg , respectively) of mixed standard proteins (TF, HSA, CA, MYO and CYT C); Lanes 3, 5, 7 and 9: differing amounts (2, 1, 0.5 and 0.3 μg , respectively) of mixed standard platinum–proteins (TF, HSA, CA, MYO and CYT C).

dimerisation. Two other high peaks are observed at around 76 and 67 kDa, corresponding to TF and HSA, respectively. Furthermore, proteins below 37 kDa (CA), around 20 kDa (MYO) and higher than 15 kDa (CYT C) also contain a fairly high amount of platinum. It is also important to remark the high amount of platinum in the stained bands of the gel. Recovery value for platinum was of 110% for non-reducing SDS-PAGE (Fig. 2c), which confirms the preservation of the platinum–protein bond. However, a lower platinum recovery, 25% (Fig. 2d), was found for traditional reducing SDS-PAGE conditions, due to the high influence of BME and temperature in platinum–protein bonds.

Therefore, it is concluded that SDS-PAGE should be performed under non-reducing conditions in order to preserve Pt–protein bonds during the separation of mixtures of Pt–proteins.

3.1.4. Detection limits

Different amounts of platinum–proteins covering the range 0.3–2.0 μg (for single proteins) were also mineralised, showing the platinum quantification, by ICP-MS, a good linearity ($r=0.951$ for TF, $r=0.992$ for HSA, $r=0.996$ for CA, $r=0.998$ for MIO and $r=0.998$ for CYT C) for all the platinum–proteins studied. Furthermore, the background recorded for all proteins is quite similar, indicating that the gel analysed could be considered as platinum-free. The limits of detection (based on 3 times the standard deviation of 6 blanks measured from one gel for the denaturing PAGE using LSB separation) were 10.1 pg for TF–cisPt, 10.3 pg for HSA–cisPt, 13.9 pg for CA–cisPt, 2.4 pg for MYO–cisPt and 4.7 pg for CYT C–cisPt. These limits of detection are satisfactory for their application to biological samples.

3.2. Separation by OFFGEL-IEF

3.2.1. Study of the effect of the reagents used for OFFGEL-IEF separations on the stability of platinum–protein bonds

In the pre-screening step it was also studied if the complex HSA–cisPt retained the platinum after treatment with the reagents typically used during OFFGEL-IEF, most often involving denaturing and reducing solutions containing urea, thiourea and DTT, as described in Section 2.3. Results are shown in Table 1B, which are also given as the percentage of platinum found in each fraction with respect to the total content in the sample. It can be seen that thiourea (Table 1, B1, B2) or denaturing solutions containing thiourea (Table 1, B5) led to the loss of a high percentage of the platinum bound to the protein (losses of about 40%) independently on the reaction time employed (5 min or 24 h). This is due to the strong reactivity of platinum compounds toward S-donor molecules and the formation of very stable $\text{Pt}^{\text{II}}\text{--S}$ bonds, which results in a competition between thiourea and the protein for platinum. A similar competition was reported between intracellular thiols and DNA, resulting in a resistance to antitumor platinum drugs [2,3].

However, the platinum protein bond resisted the action of 8 M urea, buffer ampholytes and glycerol (Table 1, B8, 98% Pt recovery), and also tolerated the DTT concentrations used for OFFGEL-IEF (B4, 85% Pt recovery). Even the treatment with a combination of the previously mentioned reagents in denaturing solutions containing DTT provided acceptable recoveries (B7, 79% Pt recovery), as long as they did not contain thiourea. The significant strength of the platinum–protein bonds was already demonstrated by Moreno-Gordaliza et al. [24].

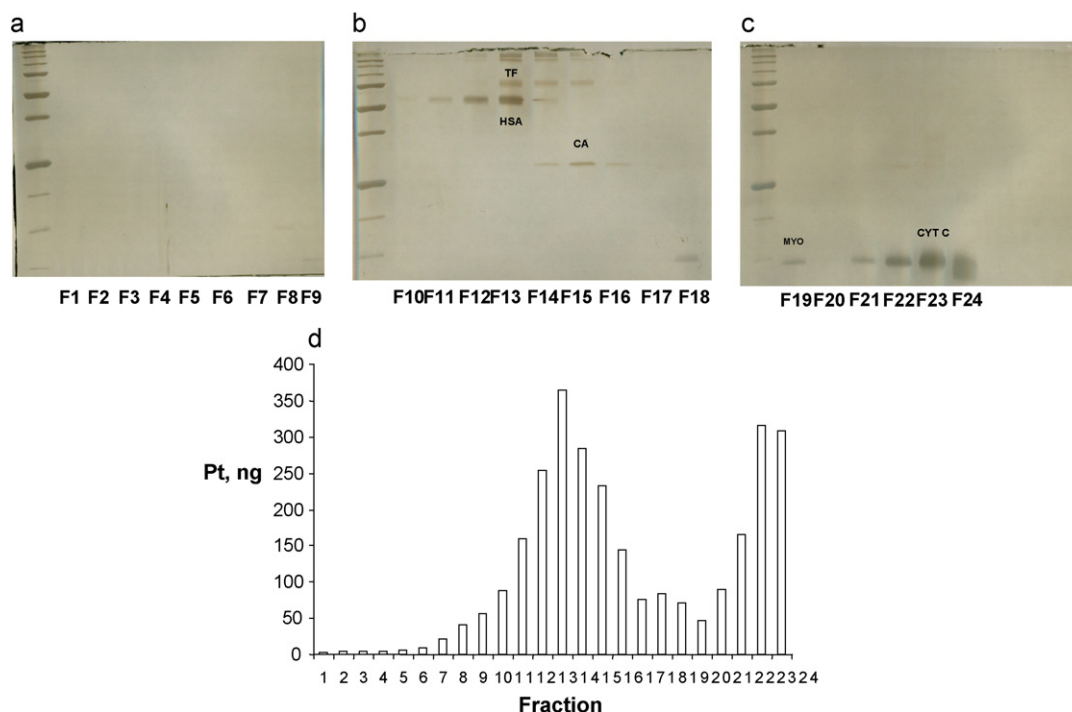


Fig. 3. Non-reducing SDS-PAGE of OFFGEL-IEF liquid fractions (24 fractions using strips with a pH range between 3 and 10) obtained under denaturing and non-reducing conditions in the absence of thiourea for the separation of a mixture of standard proteins (TF, HSA, CA, MYO and CYT C) incubated with cisplatin: (a) fractions 1–9, (b) fractions 10–18 and (c) fractions 19–24. In all figures lane 1 corresponds to Precision Plus Protein standards; (d) platinum profile obtained in the OFFGEL-IEF fractions described above with ICP-MS analysis. Gels were visualised by staining with Dodeca Silver Stain kit.

From the above results, it can be concluded that the use of thiourea has to be avoided for sample solubilisation of proteins containing platinum. Although it has been reported that the use of thiourea in addition to urea improves solubilisation, particularly of membrane proteins [30], for the separation of platinum–proteins by IEF, a denaturing solution without thiourea is recommended, being the presence or absence of DTT not so important.

3.2.2. Evaluation of the Pt–protein bonds stability in a mixture of proteins under OFFGEL-IEF separation conditions

A mixture of standard proteins (TF, HSA, CA, MYO and CYT C) incubated with cisplatin was also used to investigate the OFFGEL-IEF separation under denaturing and non-reducing conditions (without DTT) in the absence of thiourea. Protein separation takes place in a two-phase system with an upper liquid phase that is divided in compartments and a lower phase that is a conventional rehydrated IPG strip. Typically, the sample is diluted in the focusing buffer and loaded into all wells. Because there is no fluidic connection between the wells, proteins are forced to migrate through the IPG gel where the actual separation takes place. After IEF, the proteins are present in the liquid phase and can be recovered conveniently from the wells for further processing. Proteins were separated in 24 fractions, using strips with a pH range between 3.00 and 10.00. Then, proteins were identified in their respective IEF fractions visualising the proteins after a consecutive separation of the different fractions by non-reducing SDS PAGE, which is shown in Fig. 3a–c.

As can be seen, the procedure separated the proteins mainly in the following fractions (the data in brackets correspond to the expected pH ranges per fraction given by the supplier): TF (~76 kDa) in fraction F13 (6.50–6.76), F14 (6.76–7.03) and F15 (7.03–7.29); HSA (~67 kDa) in fraction F11 (5.98–6.24), 12 (6.24–6.50), F13 (6.50–6.76) and F14 (6.76–7.03); CA (~29 kDa) in fraction F14 (6.76–7.03), F15 (7.03–7.29) and F16 (7.29–7.55);

MYO (~17 kDa) in fraction F18 (7.81–8.08) and F19 (8.08–8.34); and CYT C (~12 kDa) in fraction F21 (8.60–8.86), F22 (8.86–9.13), F23 (9.13–9.29) and F24 (9.39–9.65). It can be concluded that these results are consistent with their theoretical *pI* values (6.8, 5.9, 6.4, 7.2, and 9.6 for TF, HSA, CA, MYO and CYT C, respectively). It should be noted that experimental *pI* values for Pt–proteins are displaced with respect to *pI* values obtained in a parallel experiment for proteins without cisplatin (data not shown). Moreover, Fig. 3b also shows the presence of protein dimers in the different fractions mentioned above. In addition, to evaluate the applicability of the separation protocol for platinum–protein analysis, platinum determination is needed to correlate with the presence of proteins in the fractions produced following separation by IEF. This determination was performed by ICP-MS. Fig. 3d showed the migration patterns for the mixed platinum–proteins. It can be seen that high amounts of platinum were obtained for the different fractions containing the different proteins, which indicates the preservation of the platinum–protein bond and the absence of free platinum. A recovery value of 60% was obtained for platinum.

As has been observed, proteins treated with cisplatin show important changes in their electrophoretic behavior, as they may, either dimerise or react with diverse amounts of Pt atoms with different possible ligands remaining coordinated to them, which can affect the separation by SDS-PAGE and IEF, respectively. So, separation methodologies for these samples present added difficulties. Nevertheless, in real samples, Pt-bound proteins present a lower degree of heterogeneity, due to lower Pt concentrations present in biological samples after cisplatin treatment. The OFFGEL separation method described in this work is usable when coupled to gel electrophoresis and in gel digestion of the separated bands for further peptide identification by LC-MS/MS. But most importantly, along all these procedures, it is imperative to keep platinum attached to the proteins, as was achieved and demonstrated by the previous experiments.

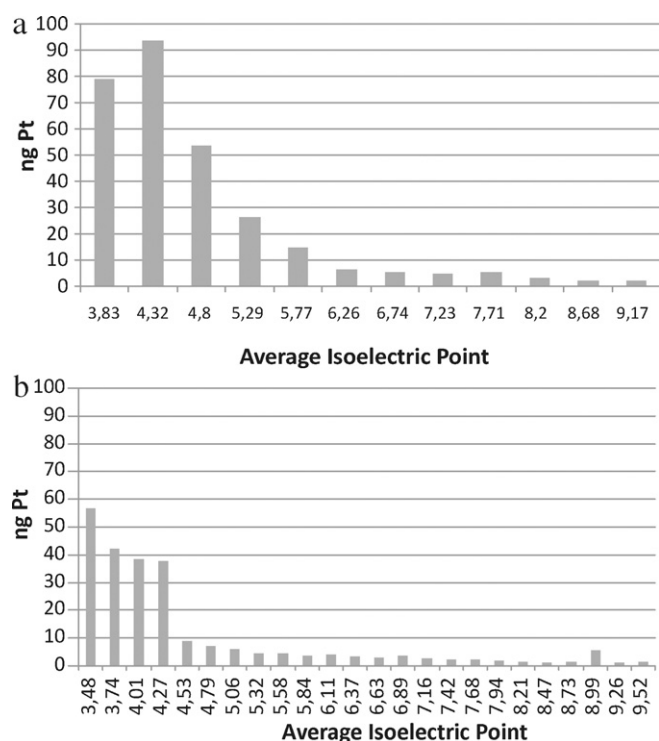


Fig. 4. Platinum profile obtained by ICP-MS analysis for the OFFGEL-IEF liquid fractions under: (a) well-established denaturing conditions (urea, thiourea, ampholytes, DTT and glycerol) (12 fractions using strips with a pH range between 3 and 10), or (b) with denaturing conditions without using thiourea or DTT (24 fractions using strips with a pH range between 3 and 10) for the separation of kidney tissue extracts containing platinum.

3.2.3. Evaluation of the stability of Pt-protein bonds in a rat kidney tissue extract under OFFGEL-IEF separation conditions

Kidney cytosols from rats treated with cis-Pt were isoelectrically fractionated in the conditions previously described, as an alternative to the classical IEF, which is performed in the presence of thiourea, for the separation of platinum binding proteins. Prior to the separation it was necessary to precipitate the proteins present in the cytosolic fraction (following the procedure described in Section 2.6.1) due to the incompatibility of the cytosolic extraction solution with the OFFGEL-IEF system. The cytosolic proteins were separated by OFFGEL-IEF under denaturing conditions (B5, in Table 1), which showed a complete solubilisation of the proteins. Proteins were separated in 12 fractions, using strips with a pH range between 3 and 10. Moreover, for comparison purposes the same tissue extracts were separated under denaturing conditions without thiourea and DTT (Table 1, B8), which showed a solubilisation of approximately 60% of the proteins. Proteins were separated in 24 fractions, using strips with a pH range between 3 and 10.

The results on the platinum determination, which was performed by ICP-MS analysis, in the different fractions produced following separation by OFFGEL-IEF, are shown in Fig. 4. A similar platinum distribution under both conditions can be seen, and a high amount of platinum was obtained mainly for the first four fractions. However, each fraction was subjected to ultrafiltration in order to measure the platinum remaining bound to the proteins. Recoveries of 23% (Fig. 4a) and 85% (Fig. 4b) for platinum bound to the proteins, were obtained after separation under denaturing and reducing conditions or denaturing conditions without DTT and thiourea, respectively. These results indicate the suitability of the OFFGEL-IEF in the absence of thiourea and DTT to separate and maintain the integrity of platinum-protein complexes.

3.3. Sample treatments for the analysis of platinum containing proteins by mass spectrometry

Structural identification of platinum binding proteins in the separated electrophoretic bands requires performing an enzymatic digestion followed by MALDI-TOF-MS or ESI-MS analysis. Thus, the stability of platinum containing proteins to some of the reagents used along an in-gel tryptic digestion and extraction procedures was also evaluated.

The influence of NH_4HCO_3 was investigated because this reagent is employed during the in-gel tryptic digestion of proteins. Overnight digestion in a Tris-HCl buffer was also included as control due to the stability under these conditions of platinum-proteins complexes already reported by Moreno-Gordaliza et al. [24]. The Pt-bound HSA fraction (i.e. >3 kDa) was also diluted 1 + 1 with NH_4HCO_3 at different concentrations, temperatures and for different reaction times, as described in Section 2.3.

As shown in Table 1C the recovery of protein bound platinum was high for these samples, between 93 and 99%, showing the suitability of all the conditions studied for tryptic digestion of platinum-proteins. Moreover, a high recovery value (98%, Table 1, C5) was also obtained in the presence of formic acid for 1 h, indicating the suitability of this reagent, widely used for ESI-MS analysis. These results may indicate that platinum-containing proteins may be able to resist the effect of the reagents tested, which are used along a classical proteomic in-gel digestion with trypsin.

3.3.1. Identification of proteins by MALDI-TOF-MS

Studies have been conducted to confirm that the Pt-protein bands, appearing at higher molecular weights in SDS-PAGE were, positively, the dimers of the treated proteins. Identification of those intense proteins bands in the gel following the SDS-PAGE separation under non-reducing conditions of the solution containing the five cisplatin-proteins complexes, running at approximately 160, 140, 60, 35 and 24 kDa, was carried out by MALDI-TOF-MS, following spot excision and tryptic *in-gel* digestion. Peptide mass fingerprinting was performed searching protein databases with either Mascot or Profound search engines. It can be concluded that TF, HSA, CA, MYO and CYT C are clearly present in the selected bands by peptide matching, which indicates protein dimerisation. Moreover, as expected, TF, HSA, CA, MYO and CYT C are also present in their corresponding bands (76, 67, 29, 17 and 12 kDa, respectively) by peptide matching. The presence of heterogeneity in proteins treated with cisplatin has been previously observed by our group (unpublished results), and are due to both, dimerisation and platinum-catalyzed specific protein fragmentation. However, only no metal-containing peptides could be found in the peptide maps and future studies will focus on the identification of the platinum binding sites and platinum-containing peptides using ESI coupled to tandem mass spectrometry.

4. Conclusions

The suitability of a 2D electrophoretic separation procedure able to preserve platinum-protein bonds has been demonstrated. This method is based on the use of sequential OFFGEL-IEF and PAGE. Furthermore, general parameters for post-separation treatments to make the proteins suitable for further structural MS analysis, preserving the platinum-protein bonds along the whole analytical procedure, have been settled. The main reason for the loss of protein-bound platinum during the separation lies on the use of some reagents, such as BME, DTT or thiourea. Therefore, the use of SDS-PAGE in the absence of BME or DTT is recommended. However, neither the influence of the electric field during electrophoresis

separation, nor the processes of fixing, staining and destaining proteins in the gel seemed to result in the loss of platinum from platinum binding proteins. The suitability of the separation of platinum binding proteins from a kidney tissue extract by OFFGEL-IEF was demonstrated.

Acknowledgement

This work was financially supported by the Spanish CICYT project CTQ-2008-04873.

References

- [1] R.F. Ozols, *Cancer Treat. Rev.* 10 (1993) 188.
- [2] J.K.C. Lau, D.V. Deubel, *Chem. Eur. J.* 11 (2005) 2849.
- [3] M.S. Robillard, J. Reedijk, in: R.B. King (Ed.), *Encyclopedia of Inorganic Chemistry*, 2nd ed., John Wiley & Sons, Ltd., Chichester, UK, 2005, p. 4488.
- [4] Z.H. Siddik, M. Jones, F.E. Boxall, K.R. Harrap, *Cancer Chemother. Pharmacol.* 21 (1998) 19.
- [5] K. Heydorn, B. Rietz, A.J. Krarup-Hansen, *J. Trace Elem. Exp. Med.* 11 (1998) 37.
- [6] O. Carrette, P.R. Burkhard, J.C. Sanchez, D. Hochstrasser, *Nat. Protoc.* 2 (2006) 812.
- [7] P.H. O'Farrell, *J. Biol. Chem.* 250 (1975) 4007.
- [8] A. Shevchenko, M. Wilm, O. Vorm, M. Mann, *Anal. Chem.* 68 (1996) 850.
- [9] C.C. Chery, L. Moens, R. Cornelis, F. Vanhaecke, *Pure Appl. Chem.* 78 (2006) 91.
- [10] J.S. Becker, M. Zoriy, C. Pickhardt, M. Przybylski, J.S. Becker, *Int. J. Mass Spectrom.* 242 (2005) 135.
- [11] A. Polatajko, M. Azzolini, I. Feldmann, T. Stuezel, N. Jakubowski, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 22 (2007) 878.
- [12] M.G. Añorbe, J. Messerschmidt, I. Feldmann, N. Jakubowski, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 22 (2007) 917.
- [13] M.S. Jiménez, M.T. Gomez, L. Rodriguez, L. Martinez, J.R. Castillo, *Anal. Bioanal. Chem.* 393 (2009) 699.
- [14] B.J. Cargile, D.L. Talley, J.L. Stephenson Jr., *Electrophoresis* 25 (2004) 936.
- [15] P.G. Righetti, A. Castagna, P. Antonoli, E. Boschetti, *Electrophoresis* 26 (2005) 297.
- [16] P.E. Michel, F. Reymond, I.L. Arnaud, J. Josserand, H.H. Girault, J.S. Rossier, *Electrophoresis* 24 (2003) 3.
- [17] P. Hörth, C.A. Miller, T. Preckel, C. Wenz, *Mol. Cell. Proteom.* 5 (2006) 1968.
- [18] T.Q. Shang, J.M. Ginter, M.V. Johnston, B.S. Larsen, C.N. McEwen, *Electrophoresis* 24 (2003) 2359.
- [19] B. Pioselli, C. Munro, A. Raab, C.L. Deitrich, K. Songsrirote, J. Feldmann, J. Thomas-Oates, *Metallomics* 1 (2009) 501.
- [20] D. Esteban-Fernández, E. Moreno-Gordaliza, B. Cañas, M.A. Palacios, M.M. Gómez-Gómez, *Metallomics* 2 (2010) 19.
- [21] S. Lustig, J. De Kimpe, R. Cornelis, P. Schramel, *Fresenius J. Anal. Chem.* 363 (1999) 484.
- [22] S. Lustig, D. Lampaert, K. De Cremer, J. De Kimpe, R. Cornelis, P. Schramel, *J. Anal. Atom. Spectrom.* 14 (1999) 1375.
- [23] R. Ma, C.W. McLeod, K. Tomlinson, R.K. Poole, *Electrophoresis* 25 (2004) 2469.
- [24] E. Moreno-Gordaliza, B. Cañas, M.A. Palacios, M.M. Gómez-Gómez, *Analyst* 135 (2010) 1288.
- [25] D. Esteban-Fernández, J.M. Verdaguer, R. Ramírez-Camacho, M.A. Palacios, M.M. Gómez, *J. Anal. Toxicol.* 32 (2008) 140.
- [26] C.S. Allardyce, P.J. Dyson, F.R. Abou-Shakra, H. Birtwistle, J. Coffey, *Chem. Commun.* 2708 (2001).
- [27] Y. Gao, C. Chen, P. Zhang, Z. Chai, W. He, Y. Huang, *Anal. Chim. Acta* 485 (2003) 131.
- [28] A. Raab, B. Pioselli, C. Munro, J. Thomas-Oates, J. Feldmann, *Electrophoresis* 30 (2009) 303.
- [29] A.I. Ivanov, J. Christodoulou, J.A. Parkinson, K.J. Barnham, A. Tucker, J. Woodrow, P.J. Sadler, *J. Biol. Chem.* 273 (1998) 14721.
- [30] T. Rabilloud, *Electrophoresis* 19 (1998) 758.

Trabajo 2

Combining TBP-based rOFFGEL-IEF with FASP and nLC-ESI-LTQ-MS/MS for the analysis of cisplatin-binding proteins in rat kidney

Talanta 120 (2014), 433-442

Este trabajo formó parte de la Comunicación presentada en formato Póster en el congreso “13^{as} Jornadas de Análisis Instrumental” celebrado en noviembre de 2011 en

Barcelona, España

y en el congreso “XVIII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica”

celebrado en junio de 2013 en Úbeda, Jaén, España



Combining TBP-based rOFFGEL-IEF with FASP and nLC-ESI-LTQ-MS/MS for the analysis of cisplatin-binding proteins in rat kidney



I. Moraleja, E. Moreno-Gordaliza, M.L. Mena, M.M. Gómez-Gómez*

Analytical Chemistry Department, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

ARTICLE INFO

Article history:

Received 3 August 2013

Received in revised form

22 November 2013

Accepted 28 November 2013

Available online 22 December 2013

Keywords:

Platinum-binding proteins

Kidney tissues

OFFGEL-IEF

FASP

ICP-MS

nLC-ESI-LTQ-MS/MS

ABSTRACT

In this work, a methodology based on a reducing IEF separation in combination with a FASP tryptic digestion able to maintain the integrity of cisplatin–protein complexes has been developed. The method is based on OFFGEL-IEF under conditions provided by the thiol-free reducing agent TBP, which allowed the separation of cisplatin-binding proteins in liquid fractions. The FASP procedure is applied as an intermediate stage between the IEF separation and MS analysis where the proteins are retained and concentrated in a commercially available ultrafiltration device. The filter unit acts as a proteomic reactor for detergent removal, buffer exchange, chemical modification (reduction and alkylation) and protein digestion. Finally, purified peptides are recovered by centrifugation. This procedure provides efficiencies comparable to standard in-solution digestion and the risk of platinum-complexes loss is minimized due to the fact that reagents employed along the process are subsequently eliminated before the following step. The stability of platinum–protein complexes under the FASP tryptic digestion, either using TBP or DTT as reducing agents, was maintained, allowing the identification of several platinum-containing peptides from cisplatin–HSA. This methodology was applied to the separation of platinum-enriched protein fractions obtained by SEC-ICP-MS in a kidney tissue extract from a rat treated with cisplatin, followed by further identification by nLC-ESI-LTQ-MS/MS after FASP tryptic digestion of selected platinum-containing liquid fractions.

© 2013 Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Cis-diamminedichloroplatinum (II) (cisplatin) is by far the most widely employed anticancer agent in the treatment of solid tumors [1,2]. However, it presents several side effects such as nephrotoxicity, neurotoxicity, ototoxicity and emetogenesis, which limit the dose that can be administered. Among all these effects, nephrotoxicity is the major dose-limiter in cisplatin therapy [3], which may result in acute renal failure [4–6]. Recent bioimaging studies performed by LA-ICP-MS [7] revealed the distribution and

accumulation of platinum in rat kidney after cisplatin treatment, showing the highest content in the cortex and corticomedullary junction. The damage exerted by the drug mainly occurs in the RPTECs of the cortex [8]. This demonstrates the connection between platinum accumulation and renal damage. The origin of these toxic effects is thought to be related to the ability of platinum to form complexes with proteins [9], mainly coordinating to S- or N-containing amino acid residues. Therefore, in the last years, efforts have been directed toward the characterization of platinum–protein complexes in biological samples under cisplatin treatment [10].

At present, the coupling of liquid chromatography to tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) is the preferred strategy for protein identification in biological samples. But to achieve the greatest amount of identified proteins, samples must be previously separated in multiple dimensions due to their complexity [11,12]. A widely used method for fractionating complex protein samples is 2-DE [13,14], which provides separations with high resolution, but is technically demanding and difficult to automate. Furthermore, large scale analysis of proteomes is challenging because protein spots have to be visualized by staining, individually excised, digested and the peptides generated need to be extracted from the gel prior to analysis by LC-MS/MS, which is a tedious and time-consuming process. To avoid these limitations, fractionation

Abbreviations: IEF, isoelectric focusing; FASP, filter-aided sample preparation; TBP, tributylphosphine; DTT, dithiothreitol; LA-ICP-MS, laser ablation-inductively coupled plasma mass spectrometry; RPTECs, renal proximal tubule epithelial cells; 2-DE, two-dimensional gel electrophoresis; IPG, immobilized pH gradient; IAA, iodoacetamide; nLC-ESI-LTQ-MS/MS, nanoliquid chromatography coupled to electrospray linear ion trap tandem mass spectrometry; rOFFGEL-IEF, reducing OFFGEL-IEF; nrOFFGEL-IEF, non-reducing OFFGEL-IEF; SEC-ICP-MS, size exclusion chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry; TF, human apotransferrin; HSA, human serum albumin; CA, carbonic anhydrase; MYO, myoglobin; CYT C, cytochrome c

* Corresponding author. Tel.: +34 394 5146.

E-mail addresses: irenemoraleja@ucm.es (I. Moraleja), estefania.moreno@quim.ucm.es (E. Moreno-Gordaliza), mariluz@ucm.es (M.L. Mena), mmgomez@ucm.es (M.M. Gómez-Gómez).

devices based on solution IEF have been developed and combined successfully with MS for proteomic applications [15–17]. Recently, several studies have demonstrated the feasibility of the OFFGEL-IEF fractionators for protein separation [18–20]. With this approach, the protein separation takes place in a two-phase system with an upper liquid phase that is divided into wells and a lower phase that is a rehydrated IPG gel strip. Typically, the protein mixture is diluted with a buffer solution, which contains urea, thiourea, DTT, carrier ampholytes and glycerol and loaded into all the wells. Because there is no liquid connection between the wells, proteins are forced to migrate through the IPG gel, where the real separation takes place. Then, focused proteins diffuse into the liquid phase and thus can be easily recovered at the end of the IEF separation, which is its main feature.

It has to be remarked that OFFGEL-IEF was originally designed for proteins without regard for the trace element which they may be carrying, and the suitability of this method for metalloproteomic separations will depend strongly on the stability of the metal–protein complexes. In fact, platinum losses may occur due to the strong reactivity of platinum compounds toward S-donor molecules, such as thiourea or DTT. We recently demonstrated that the presence of a reducing agent with thiol groups at high temperatures or during long incubation time produces deleterious effects in the binding between platinum and proteins [21]. The same was reported to occur with thiourea. As a result, it was suggested that traditional denaturing and reducing OFFGEL-IEF does not seem to maintain the whole integrity of platinum–protein complexes and separations should be performed under non-reducing conditions and in absence of thiourea in order to preserve platinum–protein complexes.

Considering these facts and the lower resolution and solubility offered under non-reducing conditions, the use of TBP is considered in this work as a possible alternative to DTT for the separation of platinum-containing proteins. The use of TBP was reported by Herbert et al. [22] as the reducing agent in both the sample solution for the first-dimensional isoelectric focusing and during the IPG equilibration procedure, and its use has increasingly spread in biochemical applications over the past years [23–27]. This is due to the fact that TBP improves protein solubility during IEF, which results in shorter run times and increased resolution. One explanation for the improved resolution is that TBP, an uncharged reducing agent, maintains reducing conditions for the entire IEF process (unlike DTT), thereby minimizing aggregation that could occur through disulfide bonding. Furthermore, TBP operates in a stoichiometric reaction, allowing the use of lower concentrations of the reagent (2 mM instead of 64 mM used for DTT). Moreover, the fact that TBP lacks sulfur groups and presents phosphorous instead, which may be less reactive towards Pt (II), makes this type of reducing agents very appealing candidates for platinum–protein complexes analysis.

After OFFGEL-IEF fractionation, proteolytic digestion prior to the analysis by LC-MS/MS needs to be carried out, to facilitate protein identification [28]. Digestions are typically done in-solution [29] and reduction and alkylation prior to digestion lead to improved peptide recoveries. Although the use of DTT and IAA within in-solution digestions still allowed detecting cisplatin–insulin peptides by nESI-MS [30], these conditions impaired the detection of certain platinum–peptides during in-gel digestion of cisplatin-incubated proteins [31], due to the aggressiveness of this kind of digestion. Therefore, the effect of reagents on the stability of platinum–protein complexes might be correlated with different factors, such as their concentration, exposure time and conditions, protein amount, platinumation degree and type of modified amino acid residues. Thereby, although the employment of sulfur-containing reagents is generally not recommended for platinum–protein complexes, their use may still be possible under certain experimental conditions.

Recently, a filter-aided sample preparation (FASP) procedure has been reported [32–34] as an alternative to in-solution digestion. In the FASP procedure, proteins are retained and concentrated in a commercially available ultra filtration device (spin filter). The filter unit then acts as a proteomic reactor for detergent removal, buffer exchange, chemical modification (reduction and alkylation) and protein digestion in the upper chamber. Finally, purified peptides are recovered by centrifugation through the membrane. It is remarkable that this procedure provides digestion efficiencies comparable to standard in-solution digestion, eliminates the reagents used in the reduction and alkylation steps prior to digestion and also allows the removal of urea and glycerol that would interfere with the MS analysis. The fact that this procedure eliminates the reagents employed along the process before the following step could minimize the risk of platinum loss for platinum–protein complexes.

The aim of this work is to evaluate the suitability of TBP for the rOFFGEL-IEF separation of the complexes formed between cisplatin and proteins. With this purpose, it was first studied on a model protein scale; and finally on high platinum to protein ratio fractions from a kidney tissue extract from a rat treated with cisplatin, where renal proteins were identified by nLC-ESI-LTQ-MS/MS. Moreover, the stability of cisplatin–protein complexes was also evaluated in the sequential reduction, alkylation and tryptic digestion under conditions provided by the FASP procedure.

2. Materials and methods

2.1. Chemicals

The platinum-based drug used was cisplatin (Sigma Aldrich Chemie, St. Louis, MO, USA). TF, HSA, CA from bovine erythrocytes, MYO from horse heart and CYT C from horse heart were also purchased from Sigma Aldrich. Sodium chloride (Panreac Química, SA, Barcelona, Spain) and 2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol (Tris, Sigma Aldrich Chemie, St. Louis, MO, USA) were used for the preparation of the incubation solution under physiological conditions.

High-purity HNO₃, used for pH adjustment of the incubation media, and HCl were obtained by distillation of the analytical-grade reagents (Merck, Darmstadt, Germany) in an acid distiller (Berghof B BSB-939IR, Eningen, Germany). Stock solutions of platinum and iridium (1000 mg L⁻¹, Merck, Darmstadt, Germany) were diluted with HCl (0.24 mol L⁻¹) to prepare ICP-MS standard solutions. Working solutions were prepared daily and diluted with HCl (0.24 mol L⁻¹) to final concentration.

For tryptic digestions, Porcine Trypsin Gold mass spectrometry grade (Promega (Madison, WI, USA)) was used. All solutions were prepared in de-ionized water (Milli-Q Ultrapure water systems, Millipore, USA), excluding those solutions which were used for tryptic digestions and nLC-ESI-LTQ-MS/MS analysis, where mass spectrometry grade water from Scharlab (Barcelona, Spain) was used.

2.2. Standard proteins–cisplatin incubations

To reproduce the physiological intracellular saline and pH conditions, TF, HSA, CA, MYO and CYT C (62 μM) were incubated separately with cisplatin at a protein: cisplatin molar ratio 1:10 in a buffer containing Tris-NO₃ (10 mM, pH 7.4) and NaCl (4.64 mM), at 37 °C in a thermostatic bath (Neslab RTE-111, MedWOW, New Hampshire, USA) for 96 h. To remove unreacted cisplatin, samples were filtered through an Amicon Ultra-0.5 mL Ultracel-3 (3.0 kDa cut-off filter, Millipore, USA) by centrifugation at 14,000g during 30 min. The retained fraction containing cisplatin-bound proteins was recovered by reversing the filter and centrifugation at 1000g

for 2 min. A further washing step of the retained protein fraction with the incubation buffer was also carried out.

Total protein concentration in the solutions was determined by the Quick Start Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). The platinum content in both fractions (retentate and filtrate) were analyzed by ICP-MS, as described in Section 2.6.

2.3. Rat kidney cytosolic extracts

2.3.1. Sample preparation

About 0.250 g of a kidney tissue from a rat, which was treated with a monodose of 16 mg cisplatin/m² of corporal surface and sacrificed three days after the treatment, as previously described [35], were dissected and homogenized in a Potter with 3.0 mL of a buffer containing Tris–HCl (10 mM), NaCl (25 mM), pH 7.40 and 12.5 μ L of a protease inhibitor cocktail (Sigma Aldrich Chemie, St. Louis, MO, USA). The homogenates were centrifuged at 15,000g for 40 min. All the preparative steps were performed at 4 °C to minimize the risk of species degradation or transformation.

For subsequent OFFGEL-IEF separations (as described in Section 2.5), a clean-up step was performed by protein precipitation. First, six volumes of acetone (80% at –20 °C) were added to one volume of the cytosolic fraction (4.5 mg total protein content) to a final volume of 2.0 mL, incubating the mixture overnight at –20 °C. Next, the mixture was centrifuged at 13,000g for 10 min and the supernatant was carefully removed and discarded. The protein pellet was then washed with 500 μ L of acetone, centrifuged as stated before, and the supernatant was again discarded.

2.3.2. SEC–ICP-MS

In a parallel experiment, pre-fractionation of platinum–protein complexes in the cytosolic renal extract was performed by size exclusion chromatography (SEC) using a Superdex™ 75 10/300 GL column (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden, separation range between 3 and 70 kDa). For the chromatographic separation, a high-pressure quaternary gradient pump (Jasco PU-2089), equipped with an injection valve (Rheodyne, USA), was used as the delivery system. The mobile phase employed was Tris–HCl 10 mM and NaCl 25 mM and pH 7.4, with a flow rate of 0.8 mL min^{–1} and 200 μ L as injection volume. For elemental monitoring, the chromatographic system was coupled to an ICP-MS. Transient mode was set to chromatographic acquisitions (channels per AMU: 10 and integration time: 0.6 ms), monitoring *m/z* 194 (Pt) and 195 (Pt). The SEC column was calibrated with protein standards. Proteins used for SEC calibration were blue dextran (> 2000 kDa), bovine albumin (66 kDa), carbonic anhydrase (29 kDa), cytochrome C (12.4 kDa) and aprotinin (6.5 kDa) (Sigma-Aldrich Chemie).

The kidney cytosolic fraction was filtered through a 0.22 μ m filter and injected into the SEC column and fractions were collected every minute (0.8 mL each). Both the platinum and protein content were determined in every fraction by ICP-MS and the Bradford assay, respectively. This allowed the location of fractions with high platinum content: e.g. fraction F17. The pool of ten identical fractions selected was subjected to the following procedure: 8.0 mL of the cytosolic extract was ultrafiltered through an Amicon Ultra-0.5 mL Ultracel-3 (3.0 kDa cut-off filter, Millipore, USA), as already described in Section 2.2. The retentate was made up to 3.6 mL (150 μ g total proteins content) with OFFGEL-IEF buffer containing TBP as reductant for further OFFGEL-IEF separations, as described in Section 2.5. Selected fractions were FASP tryptic digested as described in Section 2.4.1.

2.4. FASP procedure

2.4.1. Tryptic digestion

HSA (45 μ g) or TF (45 μ g), which had been incubated with cisplatin, were diluted with focusing buffer (urea 6.6 M, TBP 2 mM, ampholytes and glycerol 9.6%) to a final volume of 150 μ L and added to the upper chamber of a Vivacon spin filter (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany) with a nominal cutoff of 10 kDa, with slight modifications to the procedure previously described [33,36].

The sample was mixed with UA solution (0.2 mL of 8 M urea in NH₄HCO₃ 50 mM), and centrifuged at 14,000g for 15 min. The retentates were further diluted in the devices with 0.2 mL of UA solution and centrifuged again. Next, a reduction step was performed, where two reducing agents were studied (TBP 5.0 mM or DTT 5.0 mM), followed by incubation during 30 min at 37 °C. Then, IAA 20 mM in NH₄HCO₃ 50 mM was added, and incubated for 30 min at room temperature in the darkness (final volume in the reducing and alkylation stages between 150 and 200 μ L). After centrifugation, the concentrate was diluted with UB solution (0.1 mL of 1 M urea in NH₄HCO₃ 50 mM) as a clean-up step, and concentrated again. This step was repeated twice. Next, trypsin was added at 1:50 (w:w) enzyme: substrate ratio in 100 μ L of UB solution, and the samples were incubated at 37 °C overnight. Peptides were collected by centrifugation, followed by three additional 30 μ L washes with UB solution. Moreover, by adding 0.1 mL of SDS 1% and reversing the filter, the retained fraction containing non-digested platinum–proteins was collected by centrifugation at 1000g for 2 min. This step was performed twice.

The FASP procedure was also applied for the reduction, alkylation and tryptic digestion of cisplatin-containing standard proteins or cytosolic extracts. For the mixture of proteins or the protein pellet from the renal cytosolic fraction, a total protein content of 250 μ g was loaded and digested in the spin filter, as described above.

Total protein concentration in the solutions was determined by the Quick Start Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA). The platinum content in the retentate and filtrate fractions was analyzed by ICP-MS, as described in Section 2.6.

2.4.2. Separation of platinum-binding peptides by SEC–ICP-MS analysis

In a parallel experiment, the detection of platinum-containing peptides in the filtrate fraction obtained after FASP tryptic digestion was performed by SEC using a Superdex™ Peptide 10/300 GL column (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden, separation range between 0.1 and 7 kDa). For the chromatographic separation, a high-pressure quaternary gradient pump (Jasco PU-2089), equipped with an injection valve (Rheodyne, USA), was used as the delivery system. The mobile phase employed was NH₄HCO₃ 50 mM as mobile phase, with a flow rate of 0.8 mL min^{–1} and 200 μ L as injection volume. For elemental monitoring, the chromatographic system was coupled to an ICP-MS. Transient mode was set to chromatographic acquisitions (channels per AMU: 10 and integration time: 0.6 ms), monitoring *m/z* 194 (Pt) and 195 (Pt).

2.4.3. Analysis of platinum-binding peptides from cisplatin–HSA by nLC–ESI-LTQ-MS/MS analysis

Selected platinum-contained peptides from cisplatin–HSA tryptic digestion samples (around 150 μ L) were desalted by micro-solid phase extraction using OMIX C₁₈ (100 μ L, Millipore), eluted in 70% acetonitrile, 0.1% trifluoroacetic acid and evaporated in a vacuum centrifuge. Finally, digests were dissolved in 15 μ L of a solution containing 2.0% acetonitrile and 0.1% formic acid and analyzed by nLC–ESI-LTQ-MS/MS as described in Section 2.7.

2.5. OFFGEL-IEF separations

For the pI-based protein separation, the 3100 OFFGEL Kit pH 3–10 (Agilent Technologies Inc., Waldbron, Germany) with a 24 well setup was used according to the protocol of the supplier. Ten minutes prior to sample loading, 24 cm long IPG gel strips, with a linear pH gradient ranging from 3 to 10, were rehydrated in the assembled device with 40 μ L of focusing buffer (either urea 6.6 M, DTT 64 mM, ampholytes and 9.6% glycerol; or urea 6.6 M, TBP 2 mM, ampholytes and 9.6% glycerol) per well.

The mixture of standard proteins (625 μ g total protein content) or the pellet from the cytosolic fraction (4.5 mg total protein content) was diluted with the focusing buffer, which contains urea 6.6 M, TBP 2.0 mM, ampholytes and 9.6% glycerol, to a final volume of 3.6 mL, and 150 μ L of sample were loaded in each well. The sample was then focused at 20 °C with a maximum current of 50 μ A, and typical voltages ranging from 500 to 4000 V until 50 kVh⁻¹ was reached after 24 h approximately. The recovered fractions (volumes between 100 and 150 μ L) were diluted to 1.5 mL with de-ionized water for platinum determination by ICP-MS, as described in Section 2.6.

For comparison purposes, the same above mentioned amount of cisplatin-bound proteins were also separated by rOFFGEL-IEF under DTT reducing conditions. Samples were diluted with the focusing buffer, which contains urea 6.6 M, DTT 64 mM, ampholytes and 9.6% glycerol, to a final volume of 3.6 mL, and 150 μ L of sample were loaded in each well.

2.6. Platinum analysis by ICP-MS

A Quadrupole ICP-MS Thermo X-series (Thermo Electron, Windford, Cheshire, UK) equipped with a Meinhard nebulizer, a Fassel torch, and an Impact Bead Quartz spray chamber cooled by a Peltier system was employed for total platinum determination. ICP-MS operating conditions were as follows: forward power, 1250 W; plasma gas, 15 L min⁻¹; auxiliary gas, 0.73 L min⁻¹; nebulizer gas, 0.85 L min⁻¹; channels per AMU, 10; and integration time, 0.6 ms. Signals were acquired in continuous mode, monitoring *m/z* 194 (Pt), 195 (Pt), and 191 (Ir). Non-spectral interferences (matrix effects) were not observed; therefore, quantification of platinum was carried out by external calibration over the working range (0.5–10.0 μ g L⁻¹) with 10 μ g L⁻¹ iridium as internal standard (IS).

2.7. nLC-ESI-LTQ-MS/MS analyses

For peptide analysis by nLC-ESI-LTQ-MS/MS, a dual gradient system nanoLC pump (nanoLC ultra 1D Plus, Eksigent) with a Thermo Electron Micro AS autosampler was used. Aliquots of samples (5 μ L) were injected, using a 20 μ L loop and a pick-up method, and loaded on a trap-column (Reprosil pur C18, 3 μ m particle size, 0.3 mm \times 10 mm, 120 Å pore size, SGE) at a 3 μ L min⁻¹ flow rate using 2% acetonitrile, 0.1% HCOOH as mobile phase. The preconcentrated peptides were eluted and delivered in reversed flow direction at 200 nL min⁻¹ to a reverse phase micro capillary analytical column (Acclaim PepMap 100, C18, 3- μ m particle size, 75 μ m \times 15 cm, 100 Å pore size, Dionex, LC Packings). Peptide elution was performed applying a three-step gradient: 5–15% B linear for 5 min, 15–40% B linear for 40 min and 40–80% B linear for another 15 min, holding the system at 80% B for 10 min. Mobile phase B used was 99.9% ACN, 0.1% HCOOH. The column was connected to a stainless steel nano-bore emitter (O.D. 150 μ m, I.D. 30 μ m, Proxeon, Odense, Denmark) for spraying. The nHPLC system was coupled with either with a linear ion trap LTQ XL or with a linear ion trap LTQ-Orbitrap (Thermo Scientific, San Jose, CA, USA) equipped with a nano-electrospray (nESI) source from

Proxeon (Odense, Denmark). Peptides were scanned and fragmented using a triple play scan method, consisting on acquisition of full enhanced MS scans in the positive ion mode, over the *m/z* range 400–1600, followed by zoom scans and further full enhanced MS/MS, acquired in profile mode, of the three most intense peaks in the full MS scan. CID activation of ions was applied in MS/MS experiments, with 35% relative collision energy and 30 ms activation time, being isolation width of the precursor ions set to 4. Dynamic exclusion was enabled with a repeat count of 1, using a 180 s exclusion duration window. During the analysis, the parameters were typically set to capillary temperature, 200 °C; spray voltage, 1.7 kV.

For data analysis, spectra were assessed with the Xcalibur Qual Browser software (Thermo Scientific). MS/MS spectra search on NCBI protein databases using SEQUEST and MASCOT allowed the identification of proteins. The search was performed against a rat (*Rattus norvegicus*) NCBI database, assuming monoisotopic masses and fully enzymatic digestion by trypsin. Oxidation of methionines and carbamidomethylation of cysteine residues were set as variable modifications. Two missed cleavages were allowed and tolerances of 2.0 Da and 0.5 Da were selected for peptide and fragment masses. Proteins identified both with a MASCOT significant protein score using $p < 0.01$ as a significance threshold, with at least a peptide with a score above the identity threshold, with $p < 0.05$; and a Sequest P (protein) $< 10^{-3}$ were taken as valid.

Platinum peptides were recognized and identified taking into account the isotopic patterns both in the zoom scans of the precursor ions and in the MS/MS spectra. In the case of model proteins, such as HSA, search on human Uniprot KB protein databases using SEQUEST allowed the confirmation of the identity of proteins and the coverage obtained.

3. Results and discussion

3.1. Evaluation of the stability of cisplatin–protein complexes under the FASP-assisted tryptic digestion procedure

In this work, the FASP procedure will be applied as an intermediate stage between OFFGEL-IEF separation and the nLC-ESI-LTQ-MS/MS analysis. Therefore, the suitability of such tryptic digestion for cisplatin-binding proteins has been tested. First, it was studied at a model protein scale, followed by its application to a kidney tissue extract from a rat treated with cisplatin.

HSA, previously incubated with cisplatin, was employed to evaluate the cisplatin–protein complex stability under the FASP procedure. Thus, 45 μ g of cisplatin–HSA was diluted with the OFFGEL-IEF focusing buffer (to simulate the OFFGEL-IEF recovered fractions), added to the upper chamber of a commercial spin filter (10 kDa) and then, washed twice with urea 8.0 M in NH₄HCO₃ 50 mM. Next, the cisplatin-coordinated protein was reduced with TBP 5 mM, alkylated with IAA 20 mM and finally, washed again twice with urea 1.0 M in NH₄HCO₃ 50 mM. For comparison purposes, the stability of the cisplatin–HSA using DTT 5 mM as reductant was also studied. Following, cisplatin–HSA retained in the upper chamber of the spin filter were digested overnight with trypsin in a solution containing urea 1.0 M and NH₄HCO₃ 50 mM (trypsin: protein ratio 1:50, w-w), and peptides were collected by centrifugation, followed by two additional 30 μ L washes with urea 1.0 M and NH₄HCO₃ 50 mM. The recovery of the tryptic peptides obtained was about 50% of the loaded protein as measured by the Bradford protein assay in the retentate. This recovery is in agreement with those reported by Wisniewski et al. [36] for tryptic peptides on classical proteomic studies for the same spin-filters.

To evaluate the possible losses of platinum along the procedure, the platinum content in the filtrate fractions after the washing, reducing and alkylating steps was determined by ICP-MS. For both reducing agents (TBP and DTT), the percentage of platinum found in all the three filtrate fractions was lower than 15%, calculated over the total platinum content measured in the retentate and filtrate fractions, being the protein losses, due to unspecific adsorption to the filters, around 5% for all the samples. Moreover, the percentage of platinum found in the filtrate fraction after the tryptic digestion, which contains the peptides was about 40% and 39% for TBP and DTT, respectively. These results pointed out that the platinum-bound protein was stable after the reducing step using both TBP and DTT reagents. The fact that cisplatin–protein bonds even remain stable during the reducing step with DTT could be due to the short exposure time during the FASP process. Moreover, for comparing purposes, the FASP procedure was also performed under non-reducing and non-alkylating conditions, which led to a recovery of only 16% of platinum in the peptide fraction. This result clearly shows that reducing and alkylating conditions are required to obtain appropriate peptide recoveries, which is especially critical for cystine-rich proteins such as HSA.

In a further attempt to improve peptide recovery, either a higher amount of trypsin (trypsin:protein ratio 1:25, w-w) or a second tryptic digestion step were studied. A higher trypsin:protein ratio did not significantly increase the platinum–peptide recovery (around 45%). Considering the almost negligible improvement and the fact that the presence of a high concentration of trypsin can hinder the subsequent identification of the peptides by ESI, the 1:50 trypsin:protein ratio was selected. On the other hand, after a second digestion step with fresh trypsin, the additional platinum–peptide recovery obtained was 20%. By combining both filtrates, a significant high platinum–peptide global recovery (around 60%) was obtained. Therefore this latter strategy will be employed in subsequent experiments.

In order to demonstrate the applicability of the FASP method for platinum–protein complexes analysis, it was necessary to check if platinum present in the peptide fraction still remained bound to peptides. For this purpose, the cisplatin–peptide complexes obtained after the FASP procedure from cisplatin–HSA were separated by SEC–ICP-MS. The platinum SEC–ICP-MS profile for the cisplatin–peptide complexes is shown in Fig. 1a. Moreover, free cisplatin incubated for 8 h in NH_4HCO_3 50 mM (that is the medium in which peptides were present) was also separated by SEC–ICP-MS for comparing purposes, and the platinum profile is shown in Fig. 1b. As can be seen in Fig. 1a, several platinum species were obtained between 12 and 28 min, which indicates the absence of free cisplatin (which presents several platinum species with retention times approximately between 25 and 45 min, as shown in Fig. 1b). These results point out that the platinum–protein bonds in cisplatin–HSA complexes are strong enough to resist the overnight tryptic digestion, as already was reported for in-solution tryptic digestion of insulin incubated with cisplatin [9].

On the other hand, cisplatin–peptide complexes obtained after the FASP procedure on cisplatin–HSA using DTT as reductant were also analyzed by nLC–ESI-LTQ-MS/MS, leading to the protein identification with 77.3% coverage of the amino acid sequence after Sequest search. Several ions were detected with an isotopic pattern expected from platinum-containing peptides at m/z 455.44, 628.06 and 765.80, as can be seen in Figs. 2a, S1 and S2a, respectively. The CID fragmentation spectrum of the ion at m/z 455.44 (3+), which is shown in Fig. 2a allows the identification of the peptide as $[\text{C}^{65}\text{SLHTLFGDK}^{73} + \text{Pt}(\text{NH}_3)_2 + \text{Tris}]^{3+}$. With respect to the CID-MS/MS spectrum, non-platinated y -series ions were found up to y_4^+ . On the other hand, a platinated y_7^{2+} ion was observed at m/z 574.28 and 565.68, corresponding to $[\text{HTLFGDK} + \text{Pt} + \text{NH}_3 + \text{Tris}]^{2+}$ and $[\text{HTLFGDK} + \text{Pt} + \text{Tris}]^{2+}$, respectively. Moreover, platinated b_3^+ , b_4^+ , and b_5^+ ions

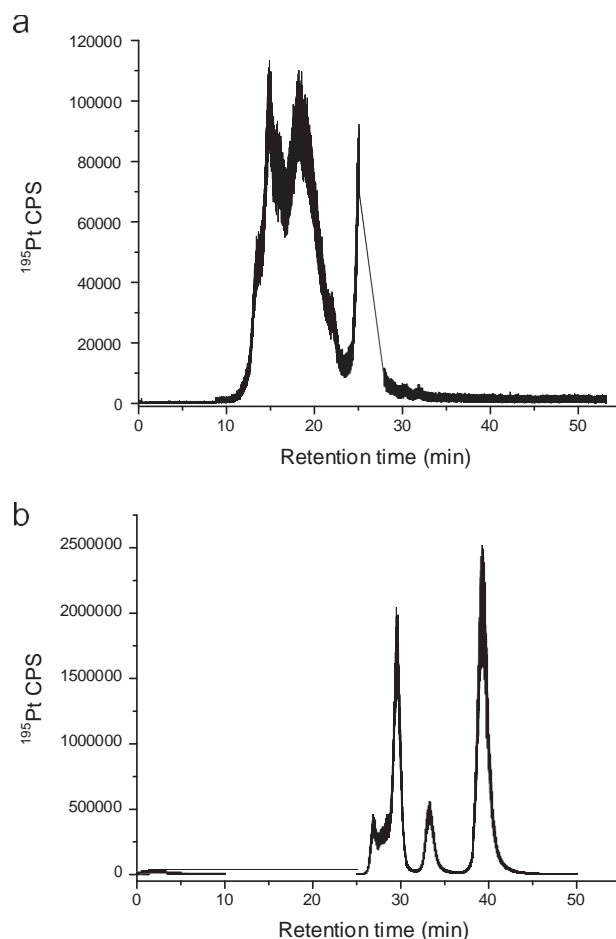


Fig. 1. SEC–ICP-MS chromatogram monitoring ^{195}Pt for (a) cisplatin–peptide complexes obtained after the FASP procedure for cisplatin–HSA, (b) cisplatin (10 μM) in NH_4HCO_3 50 mM for 8 h.

were found at m/z 668.16, 769.08 and 882.28, corresponding to $[\text{SLH} + \text{Pt} + \text{NH}_3 + \text{Tris}]^+$, $[\text{SLHT} + \text{Pt} + \text{NH}_3 + \text{Tris}]^+$, and $[\text{SLHTL} + \text{Pt} + \text{NH}_3 + \text{Tris}]^+$, respectively. The $[\text{SLHTLF} + \text{Pt} + \text{NH}_3 + \text{Tris}]^{2+}$ and $[\text{SLHTLF} + \text{Pt} + \text{Tris}]^{2+}$ fragment ions at m/z 515.20 and 506.64, respectively, were also detected and the unplatinated b_2^+ ion was found at m/z 201.04. These results point out that platinum is bound to H67. Furthermore, the peptide at m/z 628.06 (3+) was identified as $[\text{C}^{360}\text{C}^n\text{AAADPHEC}^n\text{YAK}^{372} + \text{Pt}(\text{NH}_3)_2 + \text{Tris}]^{3+}$ as can be seen in Fig. S1. According to the CID-MS/MS spectrum, unplatinated b ions were observed up to b_6^+ . Nevertheless, the first platinated b ion found was also the same ion b_6^+ , identified as $[\text{C}^n\text{C}^n\text{AAAD} + \text{Pt} + \text{Tris}]^+$, besides the ions b_8^+ and b_{11}^+ . Regarding to y series, two unplatinated ions were observed (y_5^+ and y_7^{2+}), but as in the case of b ions, the first platinum-containing ion detected was y_7^{2+} (which is $y_7^{2+} + \text{Pt}$, $y_7^{2+} + \text{Pt} + \text{Tris}$, and $y_7^{2+} + \text{Pt} + \text{NH}_3 + \text{Tris}$ at m/z 548.7, 609.02, and 617.7, respectively). These facts indicate that Pt may be coordinated to several binding sites within the sequence, probably to C361 and H367. Finally, the MS/MS spectrum of the peptide ion at m/z 765.80 (3+), allowed its identification as $[\text{C}^{241}\text{VHTEC}^n\text{C}^n\text{HGDLLC}^n\text{ADDR}^{257} + \text{Pt}(\text{NH}_3)_2]^{3+}$, being C^n carbamidomethylcysteine. Unplatinated y^+ ions were detected up to y_5^+ , and ions y_7^+ and y_{10}^+ were also identified, but the sequence could not be followed further. On the other hand, platinated b ions were found from b_7^+ to b_{15}^{2+} , as can be seen in Fig. S2a. No lower-mass platinated b -series ions could be found. These results point out H247 as the most probable binding site, although the exact platinum binding site could not be accurately located. Moreover, since the unplatinated b series is not observed, platinum may be

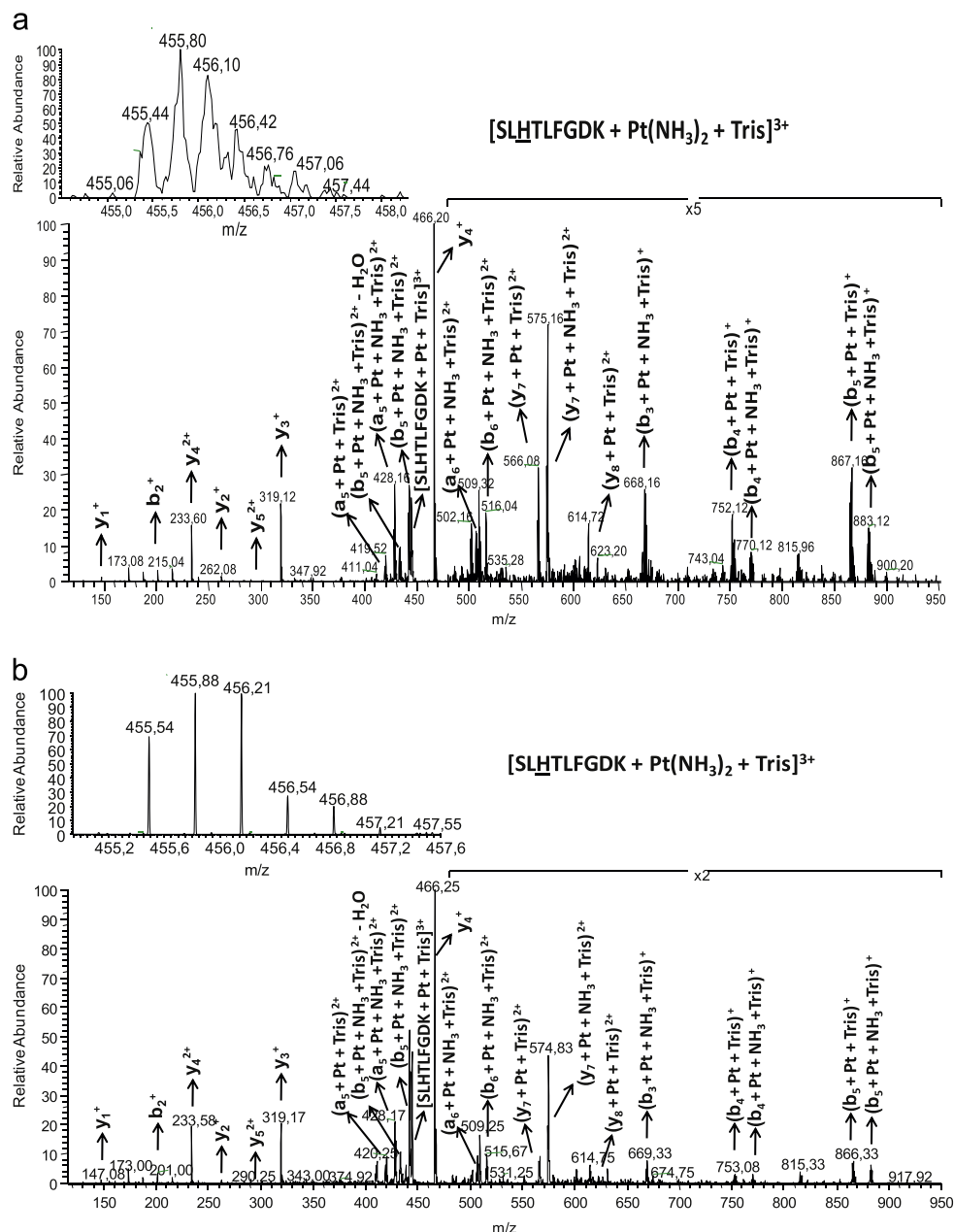


Fig. 2. CID-MS/MS spectrum of the platinum-containing peptide ion at (a) m/z 455.4 ($3+$), corresponding to $[SLHTLFGDK + Pt(NH_3)_2 + Tris]^{3+}$ (DTT reducing conditions), and (b) m/z 455.54 ($3+$), corresponding to $[SLHTLFGDK + Pt(NH_3)_2 + Tris]^{3+}$ (TBP reducing conditions) for the nLC-ESI-MS/MS analysis of the HSA tryptic digests obtained after the FASP procedure. Inset: zoom scan MS of the platinated precursor ion. **H** represents the platinum bonding site.

coordinated to several binding sites within the sequence, probably to the cysteines and histidines, as is reported in previous studies [32].

For comparison purposes, cisplatin–peptide complexes obtained after the FASP procedure from cisplatin–HSA using TBP as reductant were also analyzed by nLC-ESI-LTQ-MS/MS, leading to the protein identification with 74.8% coverage of the amino acid sequence after Sequest search. Several ions were also detected with an isotopic pattern expected from platinum-containing peptides at m/z 455.54, 703.54 and 1061.78, as can be seen in Figs. 2b, S2b and S3, respectively. The CID fragmentation spectrum of the ion at m/z 455.54 ($3+$), which is shown in Fig. 2b allows the identification of the peptide as $[^{65}SLHTLFGDK^{73} + Pt(NH_3)_2 + Tris]^{3+}$. These results point out that platinum is bound to H67. Furthermore, the peptide at m/z 703.54 ($4+$) was identified as $[^{241}VHTEC^*C^*HGDLLC^*ADDRA-DLAK^{262} + Pt(NH_3)_2]^{4+}$ as can be seen in Fig. S2b. Several unplatinated y^{2+} ions were detected, as y_6^{2+} and y_7^{2+} , and y^{2+} ions from

y_{11}^{2+} to y_{15}^{2+} . Moreover, platinated b_7^{2+} and b_9^{2+} ions were found at m/z 558.65, 549.65 and 644.67, corresponding to $[VHTEC^*C^*H + Pt]^{2+}$, $[VHTEC^*C^*H + Pt - H_2O]^{2+}$, and $[VHTEC^*C^*HGD + Pt]^{2+}$, respectively. The platinated a_7^{2+} ion was also found at m/z 544.65. No lower-mass platinated b-series ions could be found. These results indicate that H247 is the most probable binding site, although the exact platinum binding site could not be accurately located. Finally, the CID fragmentation spectrum of the ion at m/z 1061.78 allows its identification as $[^{287}SHC^*IAEVENDEMPADLPDLAADFVSK^{313} + Pt(NH_3)_2]^{3+}$, which is shown in Fig. S3. These results point out that platinum is bound to M298.

According to the protein structure, all residues of the identified sites for TBP or DTT are located at the surface, as can also be shown in Fig. S4, being accessible to cisplatin during the incubation step.

As a result of that, it can be concluded that the FASP tryptic digestion using TBP as reductant proved to be appropriate for the

identification of several platinum binding sites on the HSA, which are all located at the protein surface. Several histidines (H67, H247) and methionine (M298) were identified from the CID-MS/MS, due to the considerable affinity of platinum (II) to the imidazole nitrogens of histidine or the thioether sulfur in methionine as was earlier reported. When DTT is used as reducing agent, a number of platinum binding sites, which are also located at the surface of HSA, were also identified, corresponding to the same previous histidines (H67, H247) and histidine (H367) or cysteine (C361). These results demonstrated that platinum bound to histidine or methionine withstands the action of 5 mM TBP or 5 mM DTT during the short incubation time (1 h) used for the FASP tryptic digestion. However, when DTT is used at high concentrations (10 mM) and longer incubation time (16 h) during in-gel digestion, as was earlier reported by Moreno-Gordaliza et al. [31], only one platinum-peptide was detected, which corresponds to the major binding site M298, evidencing once more the deleterious effect of thiol-containing reagents on the platinum-peptide bonds after long reaction time with a reducing agent with thiol groups (such as DTT).

Experiments were then conducted to investigate the FASP procedure for cisplatin-TF, a mixture of standard proteins (TF, HSA, CA, MYO and CYT C) and kidney cytosols from rats treated with cisplatin. Recovery values for total platinum loaded in the spin filter was 69%, 55% and 55%, for TF, the mixture of standard proteins and the kidney cytosol, respectively. Moreover, in all cases the peptide fractions obtained were also separated by SEC-ICP-MS, demonstrating that cisplatin still bound to peptides (data not shown).

As a result of that, it is possible to conclude that the FASP procedure both using TBP or DTT as reductants is presented as a very appealing alternative for the reduction, alkylation and tryptic digestion of cisplatin-protein complexes in biological samples.

3.2. Evaluation of the cisplatin-protein complexes stability under TBP-based rOFFGEL-IEF separation

With the aim to improve the OFFGEL-IEF separation resolution during the analysis of cisplatin-protein complexes in biological samples, a rOFFGEL-IEF methodology compatible with the preservation of the cisplatin-protein bonds was investigated.

First, the metal-protein complex stability was evaluated under rOFFGEL-IEF separation using TBP as reductant, in absence of thiourea. With this purpose, a mixture of proteins (TF, HSA, CA, MYO and CYT C), which had been individually incubated in the presence of cisplatin, were used, loading 125 µg of each protein in the OFFGEL-IEF. Then, the sample was diluted in the focusing buffer (containing urea, TBP, ampholytes and glycerol) and loaded into wells. After IEF, proteins are present in the liquid phase and can be recovered conveniently from the wells for further processing. Proteins were separated in 24 fractions, using strips with a pH range between 3 and 10 (data not shown). It can be concluded that experimental pI values are consistent with the theoretical values (6.8, 5.9, 6.4, 7.2, and 9.6 for TF, HSA, CA, MYO and CYT C, respectively). In addition, to evaluate the applicability of the separation protocol for cisplatin-protein analysis, platinum determination is needed to establish its correlation with the presence of proteins in the fractions produced following separation by IEF. This determination was performed by ICP-MS. Fig. 3a showed the platinum content in each well, which reflects the migration patterns for the mixed cisplatin-proteins. It can be seen that high amounts of platinum were obtained for the different fractions containing the different proteins, which indicates the preservation of the cisplatin-protein complexes. A recovery value of 50% was obtained for platinum, calculated over the total platinum amount loaded into the rOFFGEL-IEF. Furthermore, each fraction was also subjected to ultra-filtration through 3.0 kDa cut-off filters in order to measure the platinum remaining bound to proteins. Recoveries

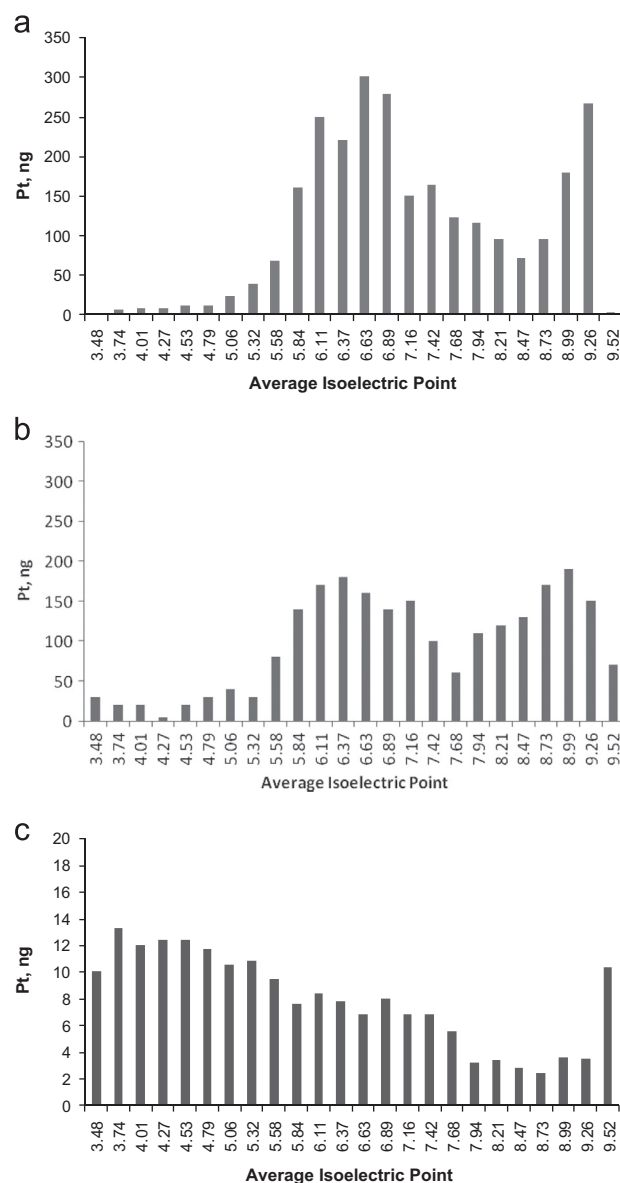


Fig. 3. Platinum profile obtained in the rOFFGEL-IEF fractions with ICP-MS analysis for: the separation of a mixture of standard proteins (TF, HSA, CA, MYO and CYT C) using (a) TBP or (b) DTT as reducing agent, or (c) the separation of kidney tissue extracts containing cisplatin using TBP as reducing agent. In all cases, the separation was performed in 24 fractions using strips with a pH range between 3 and 10.

around 95% were obtained for the platinum bound to proteins in each well.

For comparison purposes, a mixture of proteins (TF, HSA, CA, MYO and CYT C) was also separated by DTT-based rOFFGEL-IEF (Fig. 3b), providing a platinum recovery value of 34%. These results indicate that denaturing solutions containing DTT led to the release of a significant amount of the platinum bound to proteins. The significant platinum losses obtained for DTT-based rOFFGEL-IEF could be due to the high concentration of DTT (64 mM) used and the long exposure time involved during the separation (24–36 h). However, the lower concentration (5 mM) and shorter incubation time with DTT used in the FASP-assisted tryptic digestion do not produce deleterious effects in the binding between platinum and proteins, as was earlier reported in Section 3.1. These results are in agreement with early work, in which was stated that the effect of reagents on the stability of

platinum–protein complexes is correlated with different factors, such as their concentration, exposure time and conditions [21].

Next, kidney cytosols from rats treated with cisplatin were isoelectrically fractionated by TBP-based rOFFGEL-IEF. Prior to the separation, it was necessary to precipitate the proteins present in the cytosolic fraction (following the procedure described in Section 2.3.1) due to the incompatibility of the cytosolic extraction solution with the OFFGEL-IEF system. The pellet obtained showed a complete solubilization of the proteins in the focusing buffer solution (containing urea 6.6 M, TBP 2.0 mM, ampholytes and 9.6% glycerol) for the OFFGEL-IEF separation. The results on the platinum determination in the different fractions produced following separation by rOFFGEL-IEF are shown in Fig. 3c. Again, quite a good recovery value (52%) was obtained for platinum in the fractions, calculated over the total platinum amount loaded into the OFFGEL-IEF. Interestingly, this value is very close to the reference protein recovery range (65 ± 10)% assessed by the manufacturer for different standard protein mixtures using the same type of OFFGEL strips. Furthermore, recoveries around 95% were also obtained for the platinum bound to proteins in each well. This clearly indicates that TBP seems to preserve the original Pt–protein complexes during rOFFGEL-IEF.

For comparison purposes, the kidney cytosolic proteins were also separated by DTT-based rOFFGEL-IEF (data not shown), providing a platinum recovery value of 28%. These results confirm that separations with denaturing solutions containing DTT, in contrast to TBP, lead to the release of a significant amount of the platinum bound to proteins.

Therefore, it can be concluded that platinum–proteins separations by OFFGEL-IEF under reducing conditions provided by TBP are an improved alternative to non-reducing conditions, with no significant protein-bound platinum loss involved. For this reason, this reducing agent was selected for further Pt–protein separations in complex biological samples.

3.3. Analysis of cisplatin–protein complexes in a rat kidney tissue extract

The high complexity of tissue-derived protein extracts and the relatively low abundance of platinum-coordinated proteins content found along the focusing fractions result in the need to design analytical methodologies which include strategies for sample enrichment in platinum species. This way, the difficult task of identifying platinum–protein complexes could be more feasible. With this regard, two main approaches were included: (a) protein extraction of cortex (isolated from cisplatin-treated rat kidneys), which presents the highest platinum content in the organ (3-fold with respect to the medulla [37]), and where the renal damage is mainly located; (b) a pre-fractionation by SEC–ICP-MS of kidney cytosols, performed to identify the protein fractions with the highest platinum content, which were selected for further TBP-based rOFFGEL-IEF separation, followed by FASP tryptic digestion using TBP as reducing agent and nLC–ESI-MS/MS analysis.

Proteins present in the renal cortex cytosolic fraction from rats treated with cisplatin (obtained according to the procedure described in Section 2.3.1) were first separated by SEC. Fig. 4a shows the corresponding SEC–ICP-MS chromatogram for ^{195}Pt monitoring. As can be seen in Fig. 4a, platinum species were found all over the protein separation range (from 6.5 to 70 kDa, based on the molecular weight of the calibration curve for the SEC column), mainly corresponding to platinum-bound proteins. Prominent platinum peaks were found above 70 kDa (top of the calibration range, corresponding to retention times between 8 and 11 min) and below 29 kDa, at retention times between 15 and 22 min. Next, the cytosol was injected again into the SEC column and fractions were collected every minute (0.8 mL each). The protein (Fig. 4b) and platinum

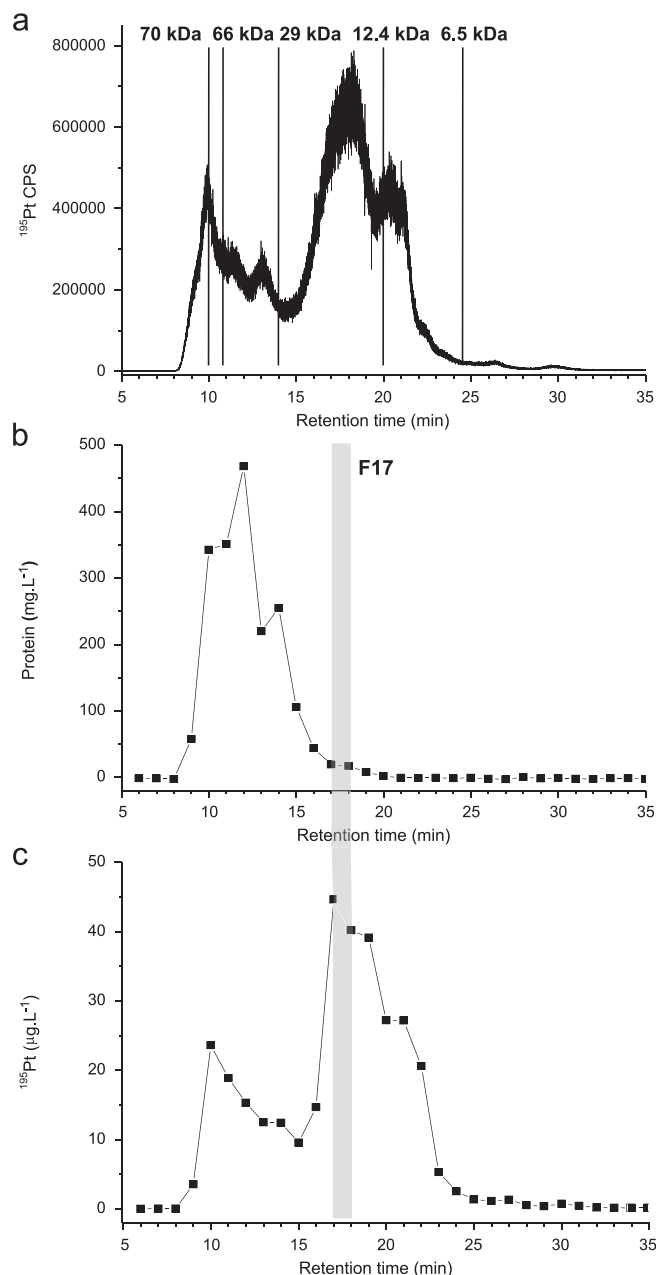


Fig. 4. (a) SEC–ICP-MS chromatogram monitoring ^{195}Pt for a kidney cytosol from a rat treated with cisplatin. Numbers correspond to molecular weight calibration markers: 70 kDa, 66 kDa, 29 kDa, 12.4 kDa and 6.5 kDa; (b) and (c) show the protein and platinum contents found in each collected 1-min interval fractions, respectively.

(Fig. 4c) content were measured (by Bradford assay and ICP-MS, respectively) in each fraction in order to identify those with a high platinum to protein ratio. As can be seen, the fractions collected at retention times between 16 and 22 min showed the highest platinum to protein ratios.

In order to avoid protein losses during the centrifugation stages of the FASP procedure (where 10 kDa cut-off filters are used), it is necessary to estimate the approximate molecular weight of proteins from the selected fractions. For this purpose, fractions of interest were filtrated through 3 and 10 kDa cut-off filters, and the platinum content was determined by ICP-MS. Results showed that around 75% protein-bound platinum contained in the fractions which elute between 16 and 18 min have a MW higher than 10 kDa. As a consequence, platinum-enriched protein fraction F17, corresponding

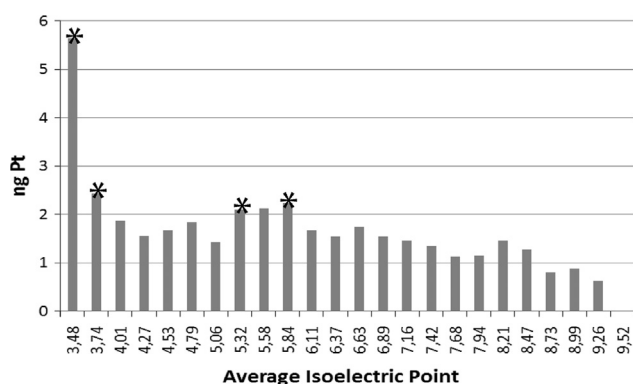


Fig. 5. Platinum profile obtained in the TBP-based OFFGEL-IEF fractions with ICP-MS analysis for the separation of the fraction F17 from a renal cortex kidney tissue extracts containing cisplatin. (*) Denotes selected wells to perform the FASP procedure and the nLC-ESI-LTQ-MS/MS analysis. The separation was performed in 24 fractions using strips with a pH range between 3 and 10.

to retention times of 17–18 min was selected for a further TBP-based rOFFGEL-IEF separation. Then, selected SEC fraction F17 with a high platinum to protein ratio content was collected after ten injections of a renal cortex cytosol from a rat treated with cisplatin, and each fraction was pooled (8.0 mL total volume). Pooled fraction was subjected to a preconcentration step (employing cut-off filters of 3 kDa) as reported in Section 2.3.2 and separated by TBP-based rOFFGEL-IEF. Proteins (150 µg) were separated in 24 fractions, using strips with a pH range between 3 and 10. The results on the platinum determination, which was performed by ICP-MS analysis, in the different fractions produced following separation by TBP-based rOFFGEL-IEF, are shown in Fig. 5. As can be seen, platinum is distributed uniformly along the 24 fractions, showing a particularly higher amount of platinum in the first fraction. Further nLC-ESI-LTQ-MS/MS analysis of selected FASP tryptic digested platinum protein fractions indicated in Fig. 5 (with the average isoelectric points 3.48, 3.74, 5.32 and 5.84) followed by SEQUEST and MASCOT search in the *Rattus norvegicus* NCBI database, allowed the identification of a number of proteins.

Complete details on the proteins identified in the platinum-enriched protein fraction F17 from the rat kidney sample are summarized in Tables S1, S2, S3 and S4. Some of the proteins identified have been previously reported to be able to react with cisplatin. These include albumin and cytochrome c [31]; or thioredoxin and chaperonin 60, which were also found for *Escherichia coli* cells treated with the anticancer drug [38]. Interestingly, the copper transporter ATX 1 was also found, being copper transporters related to the cisplatin uptake and efflux mechanisms through the cell [39].

It has to be noted that no peptides containing platinum could be found in the identified proteins, based on a parallel SEQUEST search introducing the different possible platinum moieties masses as variable modifications. This problem can be partially due to a significantly lower abundance of platinum species compared to unmodified peptides and their difficult ionization in ESI. Nevertheless, platinum was detected in low abundance proteins in the TBP-based rOFFGEL-IEF fractions due to the higher sensitivity of the ICP-MS. To date it is still a remaining challenge to detect low abundance metal-containing peptides in biological samples, as reported by several authors [7,40].

4. Conclusions

Cisplatin-binding proteins have been successfully separated by TBP-based rOFFGEL-IEF appearing as an attractive alternative to

OFFGEL-IEF separations under non-reducing conditions. The negative effect that thiol-containing reducing agents, such as DTT, have on the integrity of the platinum–protein complexes on the OFFGEL-IEF separation has been confirmed.

Furthermore, the problem to perform in-solution digestions of platinum-containing proteins under reducing conditions has been clearly overcome. The FASP procedure allows performing tryptic digestion of platinum–protein complexes, including previous reduction and alkylation steps, even when thiol-containing reducing agents are employed. The short time that the proteins remain in contact with the reducing agent (around 1 h) could be the key factor for preserving the platinum–protein complexes. Moreover, the adequate peptide recoveries obtained through this kind of digestion allowed the identification of several platinum-containing peptides from HSA.

Overall, the suitability of the thiol-free rOFFGEL-IEF for the separation of cisplatin-enriched protein fractions obtained by SEC-ICP-MS in a kidney tissue extract from a rat treated with cisplatin followed by a further identification by nLC-ESI-LTQ-MS/MS after FASP tryptic digestion was demonstrated.

In addition, the use of TBP could be clearly an advance in metalloproteomics electrophoretic separations in general, which have been claimed for many years to be necessarily performed under non-reducing conditions for metalloprotein preservation. FASP digestion is also envisioned as an advantageous and attractive option for other metalloproteins studies.

Acknowledgment

This work was financially supported by the Spanish CICYT project CTQ-2011-24585. I. Moraleja acknowledges Universidad Complutense de Madrid for a predoctoral fellowship.

Appendix A. Supplementary materials

Supplementary data associated with this article can be found in the online version at <http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.11.084>.

References

- [1] S.E. Sherman, S.J. Lippard, Chem. Rev. 87 (1987) 1153–1181.
- [2] S. Culine, Oncologie 10 (2008) 446–450.
- [3] I. Arany, R.L. Safirstein, Semin. Nephrol. 23 (2003) 460–464.
- [4] V. Sahni, D. Choudhury, Z. Ahmed, Nat. Rev. Nephrol. 8 (2009) 450–462.
- [5] N.A. Santos, C.S. Catao, N.M. Martins, C. Curti, M.L. Bianchi, A.C. Santos, Arch. Toxicol. 7 (2007) 495–504.
- [6] R.W. Schrier, J. Clin. Invest. 110 (6) (2002) 743–745.
- [7] E. Moreno-Gordaliza, C. Giesen, A. Lázaro, D. Esteban-Fernández, K. Lehmann, B. Humanes, B. Cañas, U. Panne, A. Tejedor, N. Jakubowski, M.M. Gómez-Gómez, Anal. Chem. 83 (2013) 7933–7940.
- [8] N. Pabla, Z. Dong, Kidney Int. 73 (2008) 994–1007.
- [9] E. Moreno-Gordaliza, B. Cañas, M.A. Palacios, M.M. Gómez, Anal. Chem. 81 (2009) 3507–3516.
- [10] D. Esteban-Fernández, E. Moreno-Gordaliza, B. Cañas, M.A. Palacios, M.M. Gómez-Gómez, Metallomics 2 (2010) 19–38.
- [11] P.G. Righetti, A. Castagna, B. Herbert, F. Reymond, J.S. Rossier, Proteomics 3 (2003) 1397–1407.
- [12] J. Bailey, P. Mrozinski, T. Preckel, C. Miller, J. Martosella, R. Kincaid, Curr. Trends Mass Spectrom. 11 (2006) 16–21.
- [13] O. Carrette, P.R. Burkhard, J.C. Sanchez, D. Hochstrasser, Nat. Protoc. 2 (2006) 812–823.
- [14] P.H. O'Farrell, J. Biol. Chem. 250 (1975) 4007–4021.
- [15] M. Han, M. Herlyn, A.B. Fisher, D.W. Speicher, Electrophoresis 29 (2008) 695–705.
- [16] J.K. Myung, G. Lubec, J. Proteome Res. 5 (2008) 1267–1275.
- [17] P.E. Michel, D. Crettaz, P. Morier, M. Heller, D. Gallot, J.D. Tissot, F. Reymond, J.S. Rossier, Electrophoresis 27 (2006) 1169–1181.
- [18] P. Hörth, C.A. Miller, T. Preckel, C. Wenz, Mol. Cell. Proteomics 5 (2006) 1968–1974.
- [19] P.E. Michel, F. Reymond, I.L. Arnaud, J. Jossierand, H.H. Girault, J.S. Rossier, Electrophoresis 24 (2003) 3–11.

- [20] M. Heller, M. Ye, P.R. Michel, P. Morier, D. Stadler, M.A. Junger, R. Aebersold, F. Reymond, J.S. Rossier, *J. Proteome Res.* 4 (6) (2005) 2273–2282.
- [21] M.L. Mena, E. Moreno-Gordaliza, I. Moraleja, B. Cañas, M.M. Gómez-Gómez, *J. Chrom. A* 1218 (2011) 1281–1290.
- [22] B.R. Herbert, M.P. Molloy, A.A. Gooley, B.J. Walsh, W.G. Bryson, K.L. Williams, *Electrophoresis* 19 (1998) 845–851.
- [23] G.B. Smejkal, C. Li, M.H. Robinson, A.V. Lazarev, N.P. Lawrence, E. Chernokalskaya, *J. Proteome Res.* 5 (2006) 983–987.
- [24] K. Melchior, A. Tholey, S. Heisel, A. Keller, H.P. Lenhof, E. Meese, C.G. Huber, *J. Chrom. A* 1217 (2010) 6159–6168.
- [25] V.A. Petyuk, W.J. Qian, R.D. Smith, D.J. Smith, *Methods* 50 (2) (2010) 77–84.
- [26] G.M. Campo, A. Avenoso, A. D'Ascola, M. Scuruchi, V. Prestipino, A. Calatroni, S. Campo, *Gene* 494 (1) (2012) 24–35.
- [27] J. Serrano, L.A. Higgins, B.A. Witthuhn, L.B. Anderson, T. Markowski, G.W. Holcombe, P.A. Kosian, J.J. Korte, J.E. Tietge, S.J. Degitz, *Comp. Biochem. Physiol. Part D: Genomics Proteomics* 5 (2) (2010) 138–150.
- [28] R. Aebersold, M. Mann, *Nature* 422 (2003) 198–207.
- [29] K.R. Williams, K.L. Stone, *Mol. Biotechnol.* 8 (1997) 155–159.
- [30] E. Moreno-Gordaliza, B. Cañas, M.A. Palacios, M.M. Gómez, *Analyst* 135 (2010) 1288–1298.
- [31] E. Moreno-Gordaliza, B. Cañas, M.A. Palacios, M.M. Gómez, *Talanta* 88 (2012) 599–608.
- [32] L.L. Manza, S.L. Stamer, A.J. Ham, S.G. Codreanu, D.C. Liebler, *Proteomics* 5 (2005) 1742–1745.
- [33] J.R. Wisniewski, A. Zougman, N. Nagaraj, M. Mann, *Nat. Methods* 6 (2009) 359–362.
- [34] D.C. Liebler, A.L. Ham, *Nat. Methods* 6 (2009) 785–786.
- [35] D. Esteban-Fernández, J.M. Verdaguer, R. Ramírez-Camacho, M.A. Palacios, M.M. Gómez, *J. Anal. Toxicol.* 32 (2008) 140–146.
- [36] J.R. Wisniewski, D.F. Zielinska, M. Mann, *Anal. Biochem.* 410 (2011) 307–309.
- [37] B. Humanes, A. Lázaro, S. Camano, E. Moreno-Gordaliza, J.A. Lázaro, M. Blanco-Codecido, J.M. Lara, A. Ortiz, M.M. Gómez-Gómez, P. Martín-Vasallo, A. Tejedor, *Kidney Int.* 82 (2012) 652–663.
- [38] J. Will, W.S. Sheldrick, D. Wolters, *J. Biol. Inorg. Chem.* 13 (2008) 421–434.
- [39] R. Safaei, M.H. Maktabi, B.G. Blair, C.A. Larson, S.B. Howell, *J. Inorg. Biochem.* 103 (2009) 333–341.
- [40] J.S. Becker, S. Mounicou, M.V. Zoriy, J.S. Becker, R. Lobinski, *Talanta* 76 (2008) 1183–1188.

**Combining TBP-based rOFFGEL-IEF with FASP and nLC-ESI-LTQ-MS/MS for the
analysis of cisplatin-binding proteins in rat kidney**

**Irene Moraleja, Estefanía Moreno-Gordaliza, M.Luz Mena, M. Milagros Gómez-
Gómez***

Department of Analytical Chemistry, Universidad Complutense de Madrid, Avda.
Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

*Corresponding author: Prof. Dr. M. Milagros Gómez-Gómez. E-mail:
mmgomez@ucm.es. Phone: +34 91 394 51 46. Fax: +34 91 394 43 29

APENDIX A – SUPPLEMENTARY DATA

The present document provides further information on the paper mentioned above.

Contents:

- Figures S-1 to S-3
- Tables S-1 to S-4

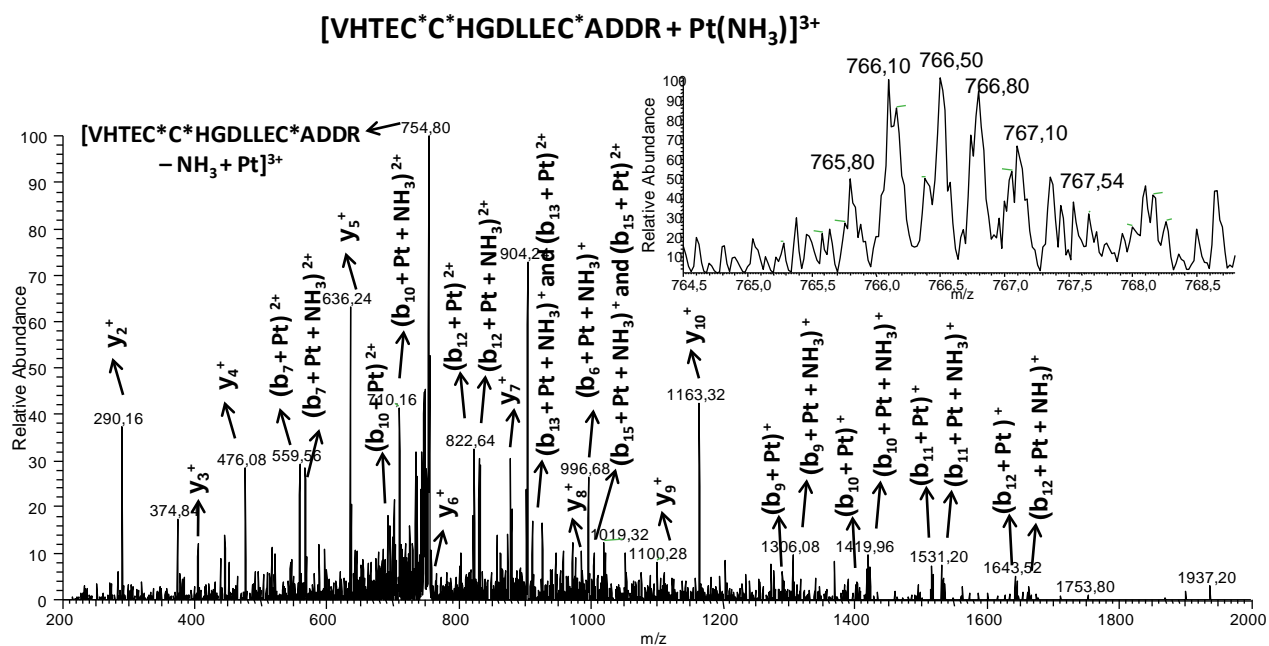


Figure S-1. CID-MS/MS spectrum of the platinated ion observed at m/z 765.8 ($3+$), corresponding to $[VHTEC^*C^*HGDLLEC^*ADDR + Pt(NH_3)]^{3+}$, during the nLC-ESI-LTQ-MS/MS analysis of the HSA digests from the FASP method. Inset: zoom scan MS of the platinated precursor ion.

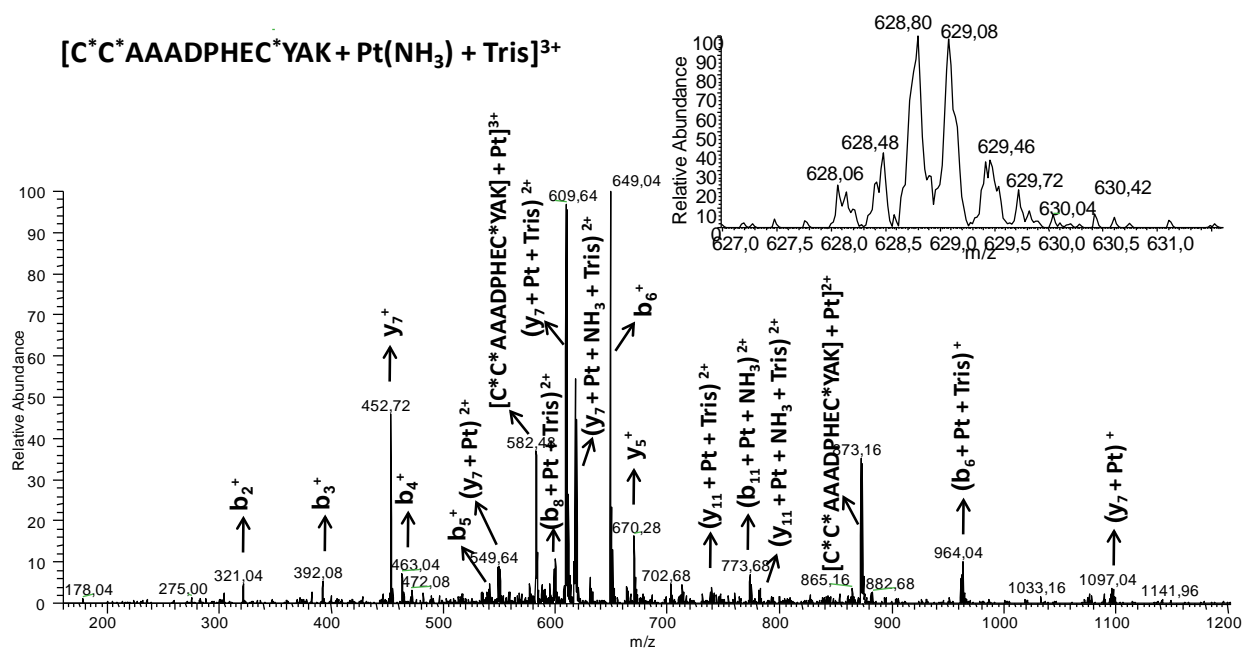


Figure S-2. CID-MS/MS spectrum of the platinated peptide ion found at m/z 628.06 (3+), corresponding to $[C^*C^*AAADPHEC^*YAK + Pt(NH_3) + Tris]^{3+}$, observed during the nLC-ESI-LTQ-MS/MS analysis of the HSA digests from the FASP method. Inset: zoom scan MS of the platinated precursor ion.

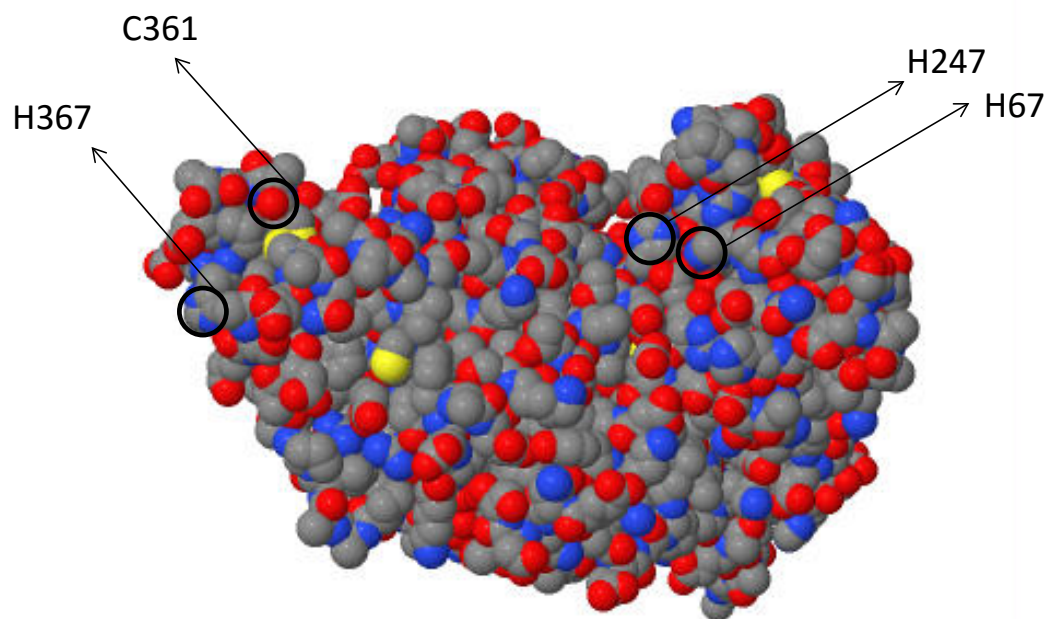


Figure S-3. CPK balls model structure of human serum albumin, showing the identified cisplatin binding sites. In the CPK model, the atoms color code is the following: C: grey, O: red, N: blue, S: yellow. (Structure retrieved from RCSB Protein Data Bank. ID: 1E78).

Table S-1. Proteins identified in well 1 from OFFGEL-IEF separation, corresponding to Fraction 17 obtained after SEC fractionation of the cytosolic fraction of kidney cortex. Liquid fraction was digested by FASP method under reducing conditions with DTT, performing two digestion stages (trypsin:protein ratio 1:50). Search was performed with Sequest and MASCOT, using a *rattus norvegicus* NCBI database.

	Accession number	Protein	MASCOT Score	Sequest Prot (prob)	Protein coverage, %	Identified sequences
1	gi 48675852	ubiquilin-1	137	1,53E-08	6.2	2
2	gi 157818715	ubiquilin-4	114	4,02E-08	8.9	2
3	gi 6981424	prosaposin precursor	85	2,09E-06	3.6	1
4	gi 6981660	lamina-associated polypeptide 2, isoform beta	82	2,01E-07	6.4	1
5	gi 224967120	granulins isoform a	52	7,93E-09	6.5	1

Table S-2. Proteins identified in well 2 from OFFGEL-IEF separation, corresponding to Fraction 17 obtained after SEC fractionation of the cytosolic fraction of kidney cortex. Liquid fraction was digested by FASP method under reducing conditions with DTT, performing two digestion stages (trypsin:protein ratio 1:50). Search was performed with Sequest and MASCOT, using a *rattus norvegicus* NCBI database.

	Accession number	Protein	MASCOT Score	Sequest Prot (prob)	Protein coverage, %	Identified sequences
1	gi 293342896	PREDICTED: nebulette	89	8,92E-09	8.3	2
2	gi 48675852	ubiquilin-1	80	1,93E-08	6.2	1
3	gi 92373398	nuclease-sensitive element-binding protein 1	80	1,33E-07	5.9	1
4	gi 157786942	nascent polypeptide-associated complex subunit alpha	70	8,94E-06	6.0	1
5	gi 224967120	granulins isoform a	63	5,71E-08	10.3	1
6	gi 6981424	prosaposin precursor	49	5,63E-05	7.6	1

Table S-3. Proteins identified in well 8 from OFFGEL-IEF separation, corresponding to Fraction 17 obtained after SEC fractionation of the cytosolic fraction of kidney cortex. Liquid fraction was digested by FASP method under reducing conditions with DTT, performing two digestion stages (trypsin:protein ratio 1:50). Search was performed with Sequest and MASCOT, using a *rattus norvegicus* NCBI database.

	Accession number	Protein	MASCOT Score	Sequest Prot (prob)	Protein coverage, %	Identified sequences
1	gi 13162363	fatty acid-binding protein, heart	189	1,18E-11	56.4	5
2	gi 158187535	retinol-binding protein 4 precursor	134	2,07E-11	44.3	3
3	gi 158138568	albumin	100	1,58E-08	16.1	3
4	gi 25742579	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	95	1,36E-07	21.9	4
5	gi 76096304	eukaryotic translation initiation factor 5A-1	86	7,28E-09	34.4	1
6	gi 62078769	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H2	83	2,42E-11	10.7	2
7	gi 61557028	transgelin-2	77	3,68E-08	58.8	1
8	gi 14010837	NSFL1 cofactor p47	70	1,19E-09	10.8	2
9	gi 16758644	thioredoxin	69	4,82E-06	12.4	1
10	gi 109497721	PREDICTED: ubiquitin B-like	68	3,66E-10	74.0	2
11	gi 55741551	coiled-coil-helix-coiled-coil-helix domain-containing protein 10, mitochondrial	67	1,33E-08	16.7	1
12	gi 293347747	PREDICTED: rCG63019-like	64	2,07E-04	33.6	2
13	gi 157819383	THO complex subunit 4	62	3,77E-10	19.6	1
14	gi 293343497	PREDICTED: Rho GTPase activating protein 18-like	62	1,94E-05	4.4	1
15	gi 77157798	ankyrinG	61	1,20E-07	0.7	1
16	gi 25453420	glutathione S-transferase P	58	6,54E-09	7.6	1
17	gi 157817658	villin-1	57	1,70E-08	3.3	1
18	gi 153791568	LOC685045 protein	57	6,67E-07	56.8	2
19	gi 8393322	protein disulfide-isomerase A3 precursor	57	1,04E-05	10.7	1
20	gi 11024674	Na(+)/H(+) exchange regulatory cofactor NHE-RF1	57	1,31E-09	14.9	1
21	gi 58865844	RNA-binding protein FUS	57	6,48E-10	10.8	1

22	gi 13592119	thymosin beta-4	56	3,85E-08	45.5	2
23	gi 6978497	protein AMBP precursor	52	6,93E-08	8.3	1
24	gi 34933260	PREDICTED: low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase-like	52	1,44E-09	14.1	2
25	gi 52138521	ezrin	51	9,90E-08	3.9	1
26	gi 157265559	heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	50	1,30E-08	4.5	1
27	gi 77628010	protein DDI1 homolog 2	50	3,43E-11	9.7	1
28	gi 16758094	fatty acid-binding protein, adipocyte	48	1,18E-11	14.7	1
29	gi 83320105	RNA-binding protein 12	48	3,82E-06	5.1	1
30	gi 42476045	cathepsin D	47	2,35E-10	9.8	1
31	gi 51854249	protein S100-A11	46	2,30E-13	16.3	1

Table S-4. Proteins identified in well 10 from OFFGEL-IEF separation, corresponding to Fraction 17 obtained after SEC fractionation of the cytosolic fraction of kidney cortex. Liquid fraction was digested by FASP method under reducing conditions with DTT, performing two digestion stages (trypsin:protein ratio 1:50). Search was performed with Sequest and MASCOT, using a *rattus norvegicus* NCBI database.

	Accession number	Protein	MASCOT Score	Sequest Prot (prob)	Protein coverage, %	Identified sequences
1	gi 158187535	retinol-binding protein 4 precursor	184	2,20E-11	40.8	4
2	gi 158138568	serum albumin precursor	171	1,83E-11	35.2	7
3	gi 61557028	transgelin-2	158	3,65E-13	56.3	3
4	gi 10863989	low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase isoform A	130	4,80E-10	52.5	5
5	gi 22219448	alpha-2u globulin PGCL3	89	1,65E-11	53.0	2
6	gi 157819383	THO complex subunit 4	88	1,28E-12	19.6	2
7	gi 16923998	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein K	86	2,04E-10	22.0	2
8	gi 25742579	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein F	81	4,55E-09	10.6	3
9	gi 13162363	fatty acid-binding protein, heart	78	4,25E-09	42.9	2

10	gi 78214333	transgelin-3	74	4,46E-09	7.0	1
11	gi 6978721	cathepsin H precursor	72	3,21E-06	17.1	1
12	gi 42476045	cathepsin D	69	1,77E-10	19.7	2
13	gi 19705459	polyadenylate-binding protein 1	67	4,87E-10	6.6	1
14	gi 34933260	PREDICTED: low molecular weight phosphotyrosine protein phosphatase-like	66	5,86E-06	14.1	1
15	gi 8393547	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	65	2,82E-10	5.0	1
16	gi 9910564	splicing factor, arginine/serine-rich 12	64	2,05E-13	4.5	1
17	gi 72255531	EF-hand domain-containing protein D2	59	2,36E-07	22.6	1
18	gi 224967120	granulins isoform a	59	2,55E-05	2.2	1
19	gi 54792127	ATP synthase subunit beta, mitochondrial precursor	59	1,08E-08	2.8	1
20	gi 18266700	heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H	59	3,73E-07	9.1	2
21	gi 17985949	hemoglobin subunit beta-1	57	1,75E-11	12.9	1
22	gi 109457705	PREDICTED: cytochrome c, somatic-like	57	2,70E-06	23.8	1
23	gi 42476144	profilin-1	57	5,79E-08	28.6	1
24	gi 8394272	nuclear migration protein nudC	56	2,58E-09	12.3	2
25	gi 206597443	chaperonin 60	55	3,28E-08	6.6	1
26	gi 16758094	fatty acid-binding protein, adipocyte	55	2,93E-07	29.3	1
27	gi 9506515	adapter molecule crk	52	1,68E-08	10.9	1
28	gi 153791568	hypothetical protein LOC685045	51	1,23E-06	46.9	1
29	gi 109513128	PREDICTED: hypothetical protein	50	1,85E-09	21.1	1
30	gi 58865448	EH domain-containing protein 1	49	9,14E-07	7.7	1
31	gi 13591985	macrophage migration inhibitory factor	48	4,33E-11	23.5	2
32	gi 11968134	mitochondrial import inner membrane translocase subunit Tim8 B	48	1,41E-06	21.7	1
33	gi 109504576	PREDICTED: protein S100-A11-like	46	7,81E-11	18.4	1
34	gi 293346859	PREDICTED: Igk protein-like isoform 1	45	1,42E-06	12.7	1

Trabajo 3

Thiol-free reducing agents in electrophoretic separations and FASP proteolytic digestions for the analysis of metal-binding proteins

MethodsX 1 (2014), e175-e180

Este trabajo formó parte de la Comunicación Oral presentada en el congreso
“Metallomics 2013” celebrado en julio de 2013 en Oviedo, España



ELSEVIER

Contents lists available at ScienceDirect

MethodsX

journal homepage: www.elsevier.com/locate/mex

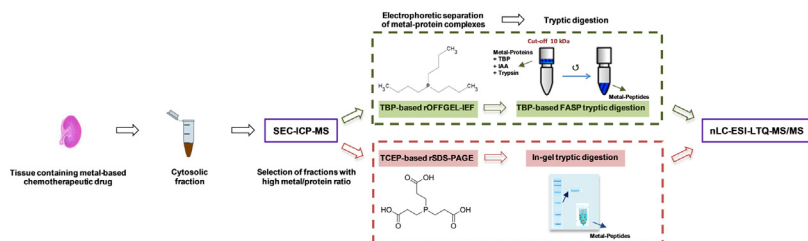
Thiol-free reducing agents in electrophoretic separations and FASP proteolytic digestions for the analysis of metal-binding proteins

I. Moraleja^a, E. Moreno-Gordaliza^{a,b}, M.L. Mena^a,
M.M. Gómez-Gómez^{a,*}

^a Analytical Chemistry Department, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

^b Division of Analytical Biosciences, LACDR, Universiteit Leiden, P.O. Box 9502, 2300 RA Leiden, The Netherlands

GRAPHICAL ABSTRACT



ABSTRACT

The analysis of the complexes between metal-based chemotherapeutic drugs and proteins in biological samples, such as cisplatin or oxaliplatin, can be a challenge due to metal strong reactivity towards S-donor molecules such as dithiothreitol (DTT) or β -mercaptoethanol (BME), usually employed as reducing agents in electrophoretic separations and proteolytic digestions for LC-MS/MS analysis.

- This protocol describes the use of the thiol-free reducing trialkylphosphines, such as tributylphosphine (TBP) and tris(2-carboxyethyl)phosphine (TCEP) as suitable reagents for the preservation of the metal-protein complexes during OFFGEL-IEF and SDS-PAGE separations, respectively.
- Moreover, the filter-aided sample preparation (FASP) method is presented as an advantageous option to perform tryptic in-solution digestions of metal-protein complexes in combination with OFFGEL-IEF separations.

* Corresponding author. Tel.: +34 394 5146.

E-mail addresses: irenemoraleja@ucm.es (I. Moraleja), emorenog@ucm.es (E. Moreno-Gordaliza), mariluz@ucm.es (M.L. Mena), mmgomez@ucm.es (M.M. Gómez-Gómez).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.mex.2014.08.003>

2215-0161/© 2014 Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

- The FASP procedure allows including previous reduction and alkylation steps in addition to proteolysis, ensuring the preservation of the metal–protein complexes. The limited time that proteins remain in contact with the reducing agent, either TBP or even DTT, during FASP could be a key factor for its extraordinary performance on the digestion of metal–protein complexes.

© 2014 Published by Elsevier B.V. This is an open access article under the CC BY license (<http://creativecommons.org/licenses/by/3.0/>).

ARTICLE INFO

Method name: SDS-PAGE, OFFGEL-IEF, FASP proteolytic digestion

Keywords: Metal-binding proteins, OFFGEL-IEF, FASP, ICP-MS, Thiol-free reductants, nLC-ESI-LTQ-MS/MS

Article history: Received 26 June 2014; Accepted 1 August 2014

Method details

Two protocols are detailed for the analysis of metal–protein complexes in biological samples, based on methods recently demonstrated for kidney cytosolic proteins from rats treated with platinum-based chemotherapeutic drugs. The described procedures include either TCEP-based rSDS-PAGE [1], or TBP-based rOFFGEL-IEF in combination with a FASP tryptic digestion [2], followed by identification by nLC-ESI-LTQ-MS/MS.

Prior to both protocols, a sample preparation step should be performed in order to obtain cytosolic protein fractions with the highest Pt to protein ratio from the metallodrug-exposed kidney by size exclusion chromatography (SEC)-ICP-MS.

Sample preparation

Materials

- Buffer solution: 10mM Tris–HCl (pH 7.4) containing 25mM NaCl. Prepare the buffer with Milli-Q grade water.
- Protease inhibitor cocktail (Sigma–Aldrich).
- Electric drill capable of a minimum of 1000r.p.m.
- Teflon–glass dounce homogenizer.
- Ultracentrifuge and 15 mL clear tubes, compatible with centrifugation at 15,000 × g.
- Ice buckets, Petri dish and a scalpel.
- Superdex™ 7510/300 GL column (GE Healthcare, separation range of 3–70kDa)
- High-pressure quaternary gradient pump (Jasco PU-2089) equipped with an Injection valve (Rheodyne).
- Chromatographic conditions: Mobile phase: 10mM Tris–NO₃, 25mM NaCl, pH 7.4; Flow rate: 0.8 mL min^{−1}; Injection volume: 200 μL.
- Quick Start Bradford protein assay (Bio-Rad)
- Quadrupole ICP-MS equipped with a Meinhard nebulizer, a fassel torch, and an impact bead quartz spray chamber cooler by a Peltier system.
- Amicon Ultra-4mL centrifugal filter (Millipore) with a nominal cut-off of 3 kDa.

Procedure

1. Place the kidney tissue (about 0.250g) from a rat treated with a pharmacological dose of a metal-based chemotherapeutic drug, such as oxaliplatin, in a Petri dish on ice and mince the tissue with a scalpel. Caution: Always wear laboratory gloves when handling and preparing solutions, samples, apparatus, etc. to prevent contamination of samples and solutions (i.e. skin keratins). This caution is to be extended to all the protocols described later.
2. Place the tissue in a tube and add 3 mL of pre-chilled buffer solution. To minimize proteolysis, add 12.5 μL of the protease inhibitor cocktail and always keep the tube on ice during steps 2–4.

3. Homogenize for a minimum of 15 min using a tight-fitting Teflon pestle attached to a power drill (set to >1000 r.p.m.) by slowly stroking the pestle up and down, taking 15 s per stroke and 30 s to complete a down and up cycle.
4. Inspect the homogenate; if intact tissue is still apparent, re-homogenize for an additional 1 min. **Caution:** Wear safety glasses and a face shield, as the glass tube may shatter if too much pressure is applied or if the drill is moved at an angle other than vertical.
5. Decant the homogenate into an appropriate-size centrifuge tube and place into a pre-cooled rotor and centrifuge at $15,000 \times g$ for 40 min.
6. Decant and save the cytosolic supernatant on an ice-bath. **▲Critical step:** all the previous preparative steps should be performed at 4 °C to minimize the risk of species degradation or transformation. Inert atmosphere is not needed. Possible species oxidation could be considered by setting oxidized methionines as variable modifications in Sequest searches. **■Pause point:** The supernatant can be kept frozen at –80 °C until required.
7. Inject the kidney cytosolic fraction through a 0.22 μ m PVDF filter to the SEC column.
8. Collect fractions every minute (0.8 mL each).
9. Determine the Pt content in each fraction by ICP-MS (monitoring ^{195}Pt isotope, channels per AMU: 10 and integration time: 0.6 ms), and the protein content by Bradford assay.
10. Identify the fractions with the highest Pt to protein ratio, which are selected for further analysis.
11. For their preconcentration and clean-up, the pool of ten identical selected SEC fractions was ultrafiltered through an Amicon Ultra-4 mL, 3 kDa cut-off filter. Collect the retentate.

Protocol A: TCEP-based rSDS-PAGE

Materials

- Bio-Rad's Laemmli sample buffer (LSB), containing Tris–HCl (62.5 mM, pH 6.8), glycerol (25%), SDS (2%) and bromophenol blue (0.01%) (Bio-Rad).
- Mini Protean[®] Tetra Cell Electrophoresis System (Bio-Rad).
- Stacking gel for rSDS-PAGE was prepared at 3%, and resolving gels at 12.5% of polyacrylamide. Commercial precast gels can alternatively be used.
- Running buffer: contains Tris–HCl (25 mM, pH 8.3), glycine (192 mM) and SDS (0.1%). Prepare the buffer with Milli-Q grade water.
- Fixing solution: Milli-Q grade water/methanol/acetic acid (72.5/20/7.5).
- Colloidal Coomassie Blue: Bio-Safe[™] Coomassie Stain (Bio-Rad).
- Trypsin Gold (MS grade, Promega).
- NanoLC system coupled to an ESI-LTQ-MS/MS instrument.
- Trap column (Reprosil pur C18, 3- μ m particle size, 0.3 mm \times 10 mm, 120 Å pore size, SGE).
- Microcapillary analytical column (Acclaim PepMap 100, C18, 3- μ m particle size, 75 μ m \times 15 cm, 100 Å pore size, Dionex, LC Packings).
- Nano-bore emitter (O.D. 150 μ m, I.D. 30 μ m, Proxeon).
- Buffer A: 2% Mass Spec-grade acetonitrile, 0.1% formic acid in mass spec-grade water.
- Buffer B: 0.1% formic acid in mass spec-grade acetonitrile.
- Database search engine such as Sequest or Mascot (Matrix Science) for protein identification.

Procedure

1. For subsequent SDS-PAGE separation, add 200 μ L LSB to the preconcentrated cytosolic fraction (the retentate fraction from step 11 (Sample preparation procedure)) and vortex.
2. Heat at 95 °C for 1 min in a thermoblock.
3. Allow to cool down the sample, and once at room temperature (RT), add TCEP to a final concentration of 50 mM. In comparison to the conventional SDS-PAGE method [3], the heating

time was shortened to 1 min and the reductant was added at a lower temperature (RT instead of 95°C).

▲Critical step: avoid boiling samples with the reductant in order to preserve the integrity of the metal–protein complexes.

4. Load the sample (a total protein content of 50 µg) into the gel wells. Start electrophoresis at constant current (12 mA per gel until samples were stacked and then the current was increased to 20 mA per gel until the end of the separation).
5. Wash the gels with Milli-Q grade water for 20 min and incubate the gel in the fixing solution for 1 h in an oscillating shaker.
6. Stain the gel with colloidal Coomassie Blue for 1 h.
7. Wash the gel twice with 20 mL of Milli-Q grade water for 1 h per wash.
8. Excise protein bands from the gels with a scalpel.
9. Wash the gel slices for at least 1 h in 500 µL of 50 mM NH_4HCO_3 . Discard the wash.
10. Wash the gel slices in 500 µL of 50% acetonitrile/50 mM NH_4HCO_3 with shaking for 1 h. Discard the wash. Cut the gel band into 1 mm² pieces and transfer to a 500 µL Protein Lo-Bind tube (Eppendorf).

▲Critical step: Make sure that the gel slices stay wet with the wash solution to facilitate cutting and transfer.

11. Add 50 µL of acetonitrile to shrink the gel pieces. After 10–15 min, remove the solvent and dry the gel slices in a centrifugal evaporator.
12. Re-swell the gel pieces with 50 mM NH_4HCO_3 containing 12.5 ng/µL of trypsin and keep them in ice during reswelling (as required, typically add 10–20 µL). Once the gels have completely re-swollen, add 50 mM NH_4HCO_3 to cover the gel pieces (around 10–20 µL). Cap the tubes tightly and cover with parafilm to avoid evaporation. Incubate at 37°C overnight (~16 h) with gentle agitation using a thermomixer at 300 r.p.m.

▲Critical step: gel pieces need to stay wet during the digestion.

13. After completing the digestion, collect supernatants and transfer them to a Lo-Bind Eppendorf, keeping them at 4°C. Next, extract the peptides remaining in the gel with 30 µL of 2% formic acid by vortexing, and incubate for 30 min at RT. Pool the extracted peptides with the original supernatant.
14. Finally, add 30 µL of a solution containing 50% acetonitrile and 0.1% formic acid, and incubate for another 30 min at RT. Pool the extraction solution with the previous ones, and evaporate samples in a vacuum centrifuge to dryness. Store the dry peptides at –80°C until required, within a few months.
15. For protein identification, analysis by nLC–ESI-LTQ-MS/MS (or a similar LC–MS/MS platform) is proposed. Resuspend the dried peptides in 10 µL of buffer A and sonicate for 10 min in an ultrasonic bath. Then start the analysis as follows: Inject aliquots of 5 µL, using a 20 µL loop and a pick-up method, and load on a trap-column at a 3 µL min^{–1} flow rate using buffer A as mobile phase. Reverse the flow at 200 nL min^{–1} to elute and transfer the pre-concentrated peptides to a reverse phase microcapillary analytical column. Elute peptides applying a three-step gradient: 5–15% B linear for 5 min, 15–40% B linear for 40 min and 40–80% B linear for another 15 min, holding the system at 80% B for 10 min. The end of the column was connected to a stainless steel nano-bore emitter for spraying and coupling with the LTQ. The spray voltage was set at 1.70 kV. Peptides were scanned and fragmented using a triple play scan method, consisting on acquisition of full enhanced MS scans in the positive ion mode, over the *m/z* range 400–1600, followed by zoom scans and further full enhanced MS/MS, acquired in profile mode, of the three most intense peaks in the full MS scan. CID activation of ions was applied in MS/MS experiments, with 35% relative collision energy and 30 ms activation time, being isolation width of the precursor ions set to 4. Dynamic exclusion was enabled with a repeat count of 1, using a 180 s exclusion duration window. For data analysis, spectra were assessed with the Xcalibur Qual Browser software (Thermo Scientific). MS/MS spectra search on NCBI protein databases using SEQUEST and MASCOT allowed the identification of proteins. The search was performed against a rat (*Rattus norvegicus*) NCBI database.

Protocol B: TBP-based rOFFGEL-IEF in combination with a FASP tryptic digestion

B1. TBP-based rOFFGEL-IEF

The following instructions assume the use of an Agilent 3100 OFFGEL Fractionator. Similar devices can also be used.

Materials

- Focusing buffer: contains urea 6.6M, TBP 2.0mM, ampholytes and 9.6% glycerol.
- Rehydration buffer: 0.96mL of focusing buffer+0.24mL of Milli-Q water.
- Agilent 3100 OFFGEL Fractionator (Agilent Technologies) with a 24-well setup kit.
- IPG Strips 24cm, pH 3–10 (store at -20°C).
- Frames, cover seal, electrode pads and mineral oil (cover fluid).

Procedure

1. For subsequent OFFGEL-IEF fractionation, add 2.88mL of focusing buffer and 0.72mL of Milli-Q grade water (3.6mL final volume) to the preconcentrated cytosolic fraction (the retentate fraction from step 11 (sample preparation procedure)) and vortex. With respect to the original OFFGEL protocol for protein separation [4], DTT was replaced by TBP.

▲Critical step: Do not add thiourea (used in the original OFFGEL protocol) to the focusing buffer, in order to preserve the integrity of the metal–protein complexes, such as cisplatin, as was earlier reported [5].

2. Place a pH 3–10 IPG strip in the system tray and rehydrate according to the manufacturer's instructions with 40 μL of rehydration buffer.

! Caution: Be careful not to touch the gel strip during the loading process.

3. Load 150 μL of sample in each well.
4. Start the fractionation as follows: focus the sample at 20°C with a maximum current of 50 μA , and typical voltages ranging from 500 to 4000V until 50 kVh^{-1} is reached after 24h, approximately.
5. After the fractionation, slowly aspirate with a pipette the liquid phase from each well. Transfer each recovered fraction (volumes between 100 and 150 μL) to different 500 μL Protein Lo-Bind Eppendorf tubes.

Pause point: The samples can be frozen at -80°C until needed.

B2. FASP procedure

OFFGEL-IEF fractions were trypsin-digested by FASP, as an alternative to the traditional in-solution tryptic digestion, as described as follows:

Materials

- Vivacon 0.5mL spin filter (Sartorius Stedim Biotech) with a nominal cutoff of 10kDa.
- UA solution: urea 8M in NH_4HCO_3 50mM.
- UB solution: urea 1M in NH_4HCO_3 50mM.
- TBP 10mM in UA solution.
- Iodoacetamide (IAA) 420mM in NH_4HCO_3 50mM.
- Trypsin Gold (MS grade, Promega).
- OMIX Tips C_{18} , 100 μL (Agilent Technologies).
- NanoLC system coupled to an ESI-LTQ-MS/MS instrument.
- Buffer A: 2% Mass Spec-grade acetonitrile, 0.1% formic acid in mass spec-grade water.
- Buffer B: 0.1% formic acid in mass spec-grade acetonitrile.
- Database search engine such as Sequest or Mascot (Matrix Science) for protein identification.

Procedure

1. Load 100 μ L of the OFFGEL-IEF fractions with a high amount of Pt (measured by ICP-MS and containing a total protein content of 250 μ g) into a Vivacon spin filter.
2. Add 200 μ L of UA solution and centrifuge at 14,000 \times g for 15 min at 25 °C. Discard the filtrate. Repeat this step.
3. Dilute the retentate 1:1 with TBP 10mM solution to a final concentration of TBP 5mM, and incubate 30min at room temperature for reducing the disulfide bonds of proteins. Centrifuge at 14,000 \times g for 15 min at room temperature. Discard the filtrate.
 ▲ Critical step: The use of TBP is a modification to the original FASP protocol [6,7]. However, the risk of metal-complexes loss is minimized even using DTT due to the fact that reagents employed along the process are subsequently eliminated by centrifugation before the following step.
4. Add IAA solution to a final concentration of 20mM, and incubate 30 min at room temperature in the dark. Centrifuge at 14,000 \times g for 15 min at room temperature. Discard the filtrate.
5. Add 100 μ L of UB solution to the protein retentate as a clean-up step. Repeat this step twice. Discard the filtrate.
6. Add 5 μ g of trypsin in 100 μ L of UB solution to the retentate, and incubate the samples at 37 °C overnight.
7. Collect the peptides by centrifugation at 14,000 \times g for 15 min at room temperature.
8. Add 30 μ L of UB solution and centrifuge at 14,000 \times g for 15 min at room temperature. Repeat this step three times, pooling all the filtrates with the peptides obtained before (Step 7).
9. Add 5 μ g of fresh trypsin to the retentate again, and collect peptides by centrifugation at 14,000 \times g for 15 min at room temperature. Add 30 μ L of UB solution and centrifuge at 14,000 \times g for 15 min at room temperature. Repeat this step three times. By combining all the filtrates (typical final volume around 250–300 μ L), a significantly high metal–peptide global recovery was obtained [2].
10. After completing the digestion step, desalt and concentrate the digests by micro-solid phase extraction using OMIX tips (C₁₈, 100 μ L) as described the manufacturer, eluting the peptides in 50 μ L of 70% acetonitrile and 0.1% formic acid. Evaporate the eluates to dryness in a centrifugal evaporator and reconstitute in 10 μ L of buffer A for nLC–ESI-LTQ-MS/MS analysis, as described earlier in the Protocol A (step 15).

Acknowledgements

This work was financially supported by the Spanish CICYT project CTQ-2011-24585. I. Moraleja acknowledges Universidad Complutense de Madrid for a predoctoral fellowship (BE43/11). E. Moreno-Gordaliza wishes to thank the European Commission for a Marie Curie intra-european fellowship (PIEF-GA-2012-329279). *MethodsX* thanks the (anonymous) reviewers of this article for taking the time to provide valuable feedback.

References

- [1] M.L. Mena, E. Moreno-Gordaliza, M.M. Gómez-Gómez, TCEP-based rSDS-PAGE and nLC–ESI-LTQ-MS/MS for oxaliplatin metal-loproteomic analysis, *Talanta* 116 (2013) 581–592, [j.talanta.2013.06.044](http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.06.044).
- [2] I. Moraleja, E. Moreno-Gordaliza, M.L. Mena, M.M. Gómez-Gómez, Combining TBP-based rOFFGEL-IEF with FASP and nLC–ESI-LTQ-MS/MS for the analysis of cisplatin-binding proteins in rat kidney, *Talanta* 120 (2014) 433–442, [j.talanta.2013.11.084](http://dx.doi.org/10.1016/j.talanta.2013.11.084).
- [3] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680–685.
- [4] P.E. Michel, F. Reymond, I.L. Arnaud, J. Jossierand, H.H. Girault, J.S. Rosier, Protein fractionation in a multicompartment device using Off-Gel™ isoelectric focusing, *Electrophoresis* 24 (2003) 3–11.
- [5] M.L. Mena, E. Moreno-Gordaliza, I. Moraleja, B. Cañas, M.M. Gómez-Gómez, OFFGEL isoelectric focusing and polyacrylamide gel electrophoresis separation of platinum-binding proteins, *J. Chromatogr. A* 1218 (2011) 1281–1290, <http://dx.doi.org/10.1016/j.chroma.2010.12.115>.
- [6] J.R. Wisniewski, A. Zougman, N. Nagaraj, M. Mann, Universal sample preparation method for proteome analysis, *Nat. Methods* 6 (2009) 359–362, <http://dx.doi.org/10.1038/NMETH.1322>.
- [7] J.R. Wisniewski, D.F. Zielinska, M. Mann, Comparison of ultrafiltration units for proteomic and N-glycoproteomic analysis by the filter-aided sample preparation method, *Anal. Biochem.* 410 (2011) 307–309, <http://dx.doi.org/10.1016/j.ab.2010.12.004>.

Trabajo 4

A shotgun approach for the identification of platinum-protein complexes

Analytical and Bioanalytical Chemistry 407 (2015), 2393-2403

Este trabajo formó parte de la Comunicación presentada en formato Póster en el congreso “XVIII Reunión de la Sociedad Española de Química Analítica” celebrado en junio de 2013 en Úbeda, Jaén, España
y como Comunicación Oral en el congreso “Metallomics 2013” celebrado en julio de 2013 en Oviedo, España

A shotgun approach for the identification of platinum–protein complexes

Irene Moraleja · Estefanía Moreno-Gordaliza ·
Diego Esteban-Fernández · M. Luz Mena ·
Michael W. Linscheid · M. Milagros Gómez-Gómez

Received: 31 October 2014 / Revised: 17 December 2014 / Accepted: 23 December 2014
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2015

Abstract A shotgun approach including peptide-based OFFGEL-isoelectric focusing (IEF) fractionation has been developed with the aim of improving the identification of platinum-binding proteins in biological samples. The method is based on a filter-aided sample preparation (FASP) tryptic digestion under denaturing and reducing conditions of cisplatin-, oxaliplatin-, and carboplatin–protein complexes, followed by OFFGEL-IEF separation of the peptides. Any risk of platinum loss is minimized throughout the procedure due to the removal of the reagents used after each stage of the FASP method and the absence of thiol-based reagents in the focusing buffer employed in the IEF separation. The platinum–peptide complexes stability after the FASP digestion and the IEF separation was confirmed by size exclusion chromatography-inductively coupled plasma-mass spectrometry (SEC-ICP-MS). The suitability of peptide-based OFFGEL-IEF fractionation for reducing the sample complexity for further nano-liquid chromatography-electrospray ionization-tandem mass spectrometry (nLC-ESI-

MS/MS) analysis has been demonstrated, allowing the detection of platinum-containing peptides, with significantly lower abundance and ionization efficiency than unmodified peptides. nLC-MS/MS analysis of selected OFFGEL-IEF fractions from tryptic digests with different complexity degrees: standard human serum albumin (HSA), a mixture of five proteins (albumin, transferrin, carbonic anhydrase, myoglobin, and cytochrome-c) and human blood serum allowed the identification of several platinum–peptides from cisplatin–HSA. Cisplatin-binding sites in HSA were elucidated from the MS/MS spectra and assessed considering the protein three-dimensional structure. Most of the potential superficial binding sites available on HSA were identified for all the samples, including a biologically relevant cisplatin-cross-link of two protein domains, demonstrating the capabilities of the methodology.

Keywords Peptide OFFGEL-IEF · FASP · Platinum–protein complexes · ICP-MS · nLC-ESI-MS/MS

Published in the topical collection *Spectrochemical Plasmas for Clinical and Biochemical Analysis* with guest editors Alfredo Sanz-Medel and María Montes Bayón.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00216-014-8452-x) contains supplementary material, which is available to authorized users.

I. Moraleja · E. Moreno-Gordaliza · M. L. Mena ·
M. M. Gómez-Gómez (✉)
Analytical Chemistry Department, Universidad Complutense de
Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain
e-mail: mmgomez@ucm.es

E. Moreno-Gordaliza
Division of Analytical Biosciences, LACDR, Universiteit Leiden,
P.O. Box 9502, 2300 RA Leiden, The Netherlands

D. Esteban-Fernández · M. W. Linscheid
Department of Chemistry, Humboldt-Universitaet zu Berlin,
Brook-Taylor Str. 2, 12489 Berlin, Germany

Introduction

The antineoplastic drug *cis*-diamminedichloroplatinum(II) (cisplatin) is still the most employed in the treatment of solid tumors. However, owing to its serious side effects, which limit the dose that can be administered [1], less toxic analogs of cisplatin (such as *trans*-L-1,2-diaminocyclohexanoxalatoplatinum (II) (oxaliplatin) and *cis*-diammine-1,1-cyclobutanedicarboxylate platinum(II) (carboplatin)) were also developed. The origin of their toxic effects is thought to be related to the ability of platinum to form complexes with proteins [2], mainly coordinating to S- or N-containing amino acid residues. Therefore, in the last years, efforts have been directed toward the characterization of platinum–protein complexes in biological samples under platinum-based drugs treatment [3].

Protein analysis and characterization by MS are usually carried out by LC-ESI-MS/MS on tryptic peptides, providing extraordinary separation efficiencies when using reversed phase columns and unrivalled identification capabilities due to the ionization characteristics of tryptic peptides and the highly predictable and clear fragmentation pattern shown by peptide ions [4, 5]. Due to its compatibility and performance, LC-ESI-MS/MS has also been demonstrated as the method of choice for platinum (or other metals)–peptide complexes identification [3]. However, efficient techniques for preparation and separation are needed to decrease the complexity of the sample before LC-MS/MS. Nevertheless, due to the limited stability of platinum–protein complexes, the critical issue is that the metal–protein bond should be preserved along all the steps involved.

Currently, in the proteomics field, in-gel isoelectric focusing (IEF) of proteins is used routinely as the first dimension of two-dimensional gel electrophoresis (2-DE) [6], which remains the workhorse for proteome analysis [7], but because further protein analysis and characterization by MS [8] require tedious sample preparation, new IEF devices have been designed for pre-fractionation of proteins. Ros et al. [9] introduced the OFFGEL-IEF with the first aim to purify proteins. The technique was later successfully used for the isoelectric fractionation of *Escherichia coli* proteins [10], proving to be a useful tool for proteomic applications based on protein separations [11, 12]. Its main advantages are the following: the simple recovery of the focused proteins in liquid phase that can be directly analyzed by LC-MS/MS, high resolution, high reproducibility, high loading capacity, and the possibility to run several samples simultaneously.

Regarding metalloproteomic separations, metal losses have been reported during protein–IEF fractionation under well-established denaturing and reducing conditions (urea, thio-urea, dithiothreitol (DTT), ampholytes, and glycerol), and in most cases, the use of native-IEF has been proposed to overcome the problem. Shang et al. [13] successfully performed native-IEF on myoglobin and yeast-soluble proteins. Pioselli et al. [14] separated mixtures of metalloproteins containing copper, zinc, and iron by IEF under denaturing and novel non-denaturing separation conditions. Denaturing conditions resulted in the separation of metalloprotein mixtures with higher resolution, although the stability of the metal complexes was affected.

In the case of platinum–protein complexes, traditional denaturing and reducing conditions for the electrophoretic separation involved in OFFGEL-IEF [15] do not maintain the integrity of platinum–protein complexes probably due to the strong reactivity of platinum compounds toward S-donor molecules, such as thiourea or DTT. Therefore, the separation under non-reducing conditions and in the absence of thiourea was proposed [15]. However, considering the higher resolution and solubility offered under reducing conditions, the use

of the thiol-free reductant tributylphosphine (TBP) as an alternative to DTT for the OFFGEL-IEF separation of platinum-containing proteins has been recently proposed [16].

Besides these efforts to develop OFFGEL-IEF methods for protein separation, in the last years, the use of IEF for peptide separation in a shotgun approach has been investigated. The peptide IEF methodology was first applied in 2004 on *E. coli* proteome [17]. Since then, it has been widely adopted in several clinical studies [18–21]. Working at the peptide level has a number of analytical benefits, such as the prevention of protein interactions, easier sample manipulation, and the possibility to analyze small or hydrophobic proteins that are usually problematic with a protein IEF approach [22]. Furthermore, peptides possess a greater solubility in a wider range of solvents, and liquid chromatography separations and MS detection of peptides are superior to those performed at protein level [23]. Moreover, the shotgun approach making use of peptide OFFGEL followed by LC-MS/MS allows superior protein identification than the conventionally used gel electrophoresis protein separation followed by in-gel digestion and LC-MS approach [24]. On the other hand, it offers a comparable performance in terms of identified proteins to that of MudPIT (a common shotgun approach previously proposed for platinum–proteins) in medium complexity protein samples. However, its performance is predictably superior too in the case of high complexity samples due to the more accurate peptide focusing achieved by OFFGEL as compared to the first separation dimension of MudPIT (SCX) (84 % of all peptides are only detected in a single OFFGEL fraction, as compared to 53 % for MudPIT) [25]. This is especially important for low abundance proteins identification, as in the case of platinum–protein complexes in biological samples, present at much lower levels than unmodified proteins.

Regarding platinum-binding proteins, the fact that peptide-based OFFGEL-IEF does not require the use of reducing reagents typically employed in the focusing buffer for protein-based separations could also minimize the risk of metal loss, making this procedure an excellent candidate for the separation of platinum–peptide complexes. Moreover, to date, it is still a remaining challenge to detect metal-containing peptides in the MS spectra of biological samples, either in complex or simple samples (such as tryptic digests of model proteins), as reported by several authors [26, 27]. This problem can be partially due to a significantly lower abundance of metal species as compared to unmodified peptides and their poorer ionization in ESI-MS/MS. In this sense, simplified fractions after IEF can help to identify low abundance platinum-containing peptides.

Before peptide-based OFFGEL-IEF separation, proteolytic digestion of proteins needs to be carried out. Recently, a FASP procedure has been reported as an alternative to in-solution digestion [28] by several authors [29–31]. The FASP procedure greatly reduces the time required for sample preparation;

minimizes sample loss; provides digestion efficiencies comparable to standard in-solution digests; avoids lengthy dialysis steps; allows rapid cleanup of samples containing salts, some detergents, and acidic or basic buffers; and provides MS sequence coverage of identified proteins that is equivalent to that for in-solution digestion of purified protein samples. Moreover, cisplatin–protein complexes have been recently proved to be successfully tryptically digested with the FASP procedure under denaturing and reducing conditions (both in the presence of DTT and TBP) with no significant loss of platinum [2]. The greatest advantage of the FASP method for the generation of cisplatin-bound peptides is the possibility to treat the proteins with reducing and alkylating agents, which are sequentially removed from the filter, minimizing contact time and, therefore, avoiding possible side reactions leading to platinum loss. Therefore, FASP digestion serves in this study as an appropriate starting point to generate platinum–peptides.

In the present work, the suitability of a shotgun approach comprising FASP protein digestion, peptide-based OFFGEL-IEF fractionation, and nLC-ESI-MS/MS analysis has been investigated for the characterization of platinum–protein complexes. The FASP procedure, previously studied for the sequential reduction, alkylation, and tryptic digestion of cisplatin–HSA complexes [16], has been evaluated for oxaliplatin- and carboplatin–protein complexes.

Materials and methods

Chemicals

Cisplatin, oxaliplatin, carboplatin, human serum albumin (HSA), human apo-transferrin (TF), carbonic anhydrase from bovine erythrocytes (CA), myoglobin from horse heart (MYO), cytochrome c from horse heart (CYT c), and human blood serum (from human male AB plasma, USA origin, sterile-filtered) were purchased from Sigma-Aldrich Chemie (St. Louis, MO, USA). Sodium chloride (Panreac Química, SA, Barcelona, Spain) and 2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol (Tris, Sigma-Aldrich Chemie) were used for the preparation of the incubation solution under physiological conditions.

High-purity HNO_3 used for pH adjustment of the incubation media and HCl were obtained by distillation of the analytical-grade reagents (Merck, Darmstadt, Germany) in an acid distiller (Berghof B BSB-939IR, Eningen, Germany). Stock solutions of platinum and iridium (1000 mg L^{-1} , Merck, Darmstadt, Germany) were diluted with HCl (0.24 mol L^{-1}) to prepare elemental standard solutions. Working solutions were prepared daily and diluted with HCl (0.24 mol L^{-1}) to final concentration.

For tryptic digestions, porcine trypsin Gold mass spectrometry grade (Promega, Madison, WI, USA) was used. All

solutions were prepared in de-ionized water (Milli-Q Ultra-pure water systems, Millipore, USA), excluding those solutions which were used for tryptic digestions and nLC-ESI-MS/MS analysis, where MS grade water from Scharlab (Barcelona, Spain) was used.

Incubation of standard proteins and human blood serum with platinum-based drugs

HSA, TF, CA, MYO, CYT c ($62 \text{ } \mu\text{M}$ each), and human blood serum ($50 \text{ } \mu\text{M}$) were incubated separately with cisplatin, oxaliplatin, or carboplatin at a protein/cisplatin molar ratio of 1:10 under physiological conditions (pH 7.4; 37°C) in a thermostatic bath (Neslab RTE-111, MedWOW, New Hampshire, USA) for 96 h. To remove unreacted cisplatin, oxaliplatin, or carboplatin, samples were filtered through a 3-kDa cutoff filter (Amicon Ultra-0.5 mL Ultracel-3, Millipore, USA) by centrifugation at $14,000g$ and 37°C for 30 min. The retained fraction containing platinum–protein complexes was recovered by filter reversal and centrifugation at $1000g$ for 2 min. A further washing step of the retained protein fraction with the incubation buffer was also carried out.

Total protein concentration was determined by the Quick Start Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories, Inc., Hercules, CA, USA).

FASP-assisted tryptic digestion procedure

The FASP procedure was applied for the reduction, alkylation, and tryptic digestion of either cisplatin-, oxaliplatin-, or carboplatin-incubated standard proteins or human blood serum in accordance with the procedure described elsewhere [16]. For the HSA, the mixture of proteins (HSA, TF, CA, MYO, and CYT c) and the human blood serum, a total protein content of $250 \text{ } \mu\text{g}$ was loaded and digested in the upper chamber of a Vivacon spin filter (Sartorius Stedim Biotech, Goettingen, Germany) with a nominal cutoff of 10 kDa .

The sample was mixed with UA solution (0.2 mL of 8 M urea in NH_4HCO_3 50 mM) and centrifuged at $14,000g$ for 15 min. The concentrates were diluted in the devices with additional 0.2 mL of UA solution and centrifuged again. Next, a reduction step was performed using DTT 5 mM , followed by incubation for 30 min at 37°C . Then, iodoacetamide (IAA) 20 mM in NH_4HCO_3 50 mM was added and incubated for 30 min at room temperature in the dark (the final volume in the reducing and alkylation steps typically ranged between 150 and $200 \text{ } \mu\text{L}$). After centrifugation, the concentrate was diluted with UB solution (0.1 mL of 1 M urea in NH_4HCO_3 50 mM) as a cleanup step and concentrated again. This step was repeated twice. Next, trypsin was added at an enzyme-to-protein ratio of 1:50 in $100 \text{ } \mu\text{L}$ of UB solution, and the samples were incubated at 37°C overnight. Finally, peptides were

collected by centrifugation, followed by three additional washing steps with 30 μL UB solution.

Peptide-based OFFGEL-IEF separation

For the pI-based peptides separation, the 3100 OFFGEL Kit pH 3–10 (Agilent Technologies Inc., Waldbron, Germany) with a 24-well setup was used in accordance with the protocol by the supplier. Ten minutes prior to sample loading, 24-cm-long immobilized pH gradient (IPG) gel strips, with a linear pH gradient ranging from 3 to 10, were rehydrated in the assembled device with 40 μL of focusing buffer (ampholytes and 9.6 % glycerol) per well.

Tryptic digests of the cisplatin-, oxaliplatin-, or carboplatin-incubated proteins (standard HSA, the mixture of standard proteins or human blood serum; 250 μg total proteins content for all the samples) were diluted to a final volume of 3.6 mL with the focusing buffer, and 150 μL of the sample was loaded in each well. The sample was then focused at 20 °C with a maximum current of 50 μA , and a typical voltage (ranging from 500 to 4000 V until 50 kVh^{-1}) was reached after 48 h approximately. The recovered fractions (volumes between 100 and 150 μL) were diluted to 1.5 mL with deionized water for platinum determination by ICP-MS, as described below.

Platinum analysis by ICP-MS

A Quadrupole ICP-MS Thermo X-series (Thermo Electron, Windford, Cheshire, UK) equipped with a Meinhard nebulizer, a Fassel torch, and an Impact Bead Quartz spray chamber cooled by a Peltier system was employed for total platinum determination in the fractions obtained after peptide-based OFFGEL-IEF. ICP-MS operating conditions were the following: forward power, 1250 W; plasma gas, 15 L min^{-1} ; auxiliary gas, 0.73 L min^{-1} ; nebulizer gas, 0.85 L min^{-1} ; channels per AMU, 10; and integration time, 10 ms. Signals were acquired in continuous mode, monitoring ^{194}Pt , ^{195}Pt , and ^{191}Ir isotopes. Neither spectral nor non-spectral interferences (matrix effects) were observed; therefore, quantification of platinum was carried out by external calibration over the working range (0.5–10.0 $\mu\text{g L}^{-1}$) with 10 $\mu\text{g L}^{-1}$ iridium as internal standard (IS).

SEC-ICP-MS analysis of OFFGEL-IEF-fractionated platinum–peptides

The detection of platinum-containing peptides in the collected fractions after peptide-based OFFGEL-IEF was performed by size exclusion chromatography (SEC) using a SuperdexTM Peptide 10/300 GL column (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Sweden, separation range between 0.1 and 7 kDa). For

the chromatographic separation, a high-pressure quaternary gradient pump (Jasco PU-2089, Tokyo, Japan) equipped with a 6-port injection valve (Rheodyne, USA) and an injection loop of 200 μL was used as delivery system. The mobile phase employed was NH_4HCO_3 50 mM at a 0.8 mL min^{-1} flow rate. For elemental monitoring, the chromatographic system was coupled to an ICP-MS (Thermo X-Series). Transient mode was set to chromatographic acquisition, monitoring ^{194}Pt and ^{195}Pt isotopes.

Analysis of platinum–peptides in IEF-fractionated tryptic digests by nLC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS

Selected IEF fractions containing cisplatin–peptide complexes from standard HSA, a mixture of standard proteins, or human blood serum tryptic digestions (ca. 150 μL) were desalted by solid-phase extraction using OMIX C_{18} (100 μL , Agilent Technologies) eluted in 70 % acetonitrile and 0.1 % formic acid and evaporated in a vacuum centrifuge. Finally, digests were reconstituted in 15 μL of a solution containing 5 % acetonitrile and 0.1 % formic acid and analyzed by nLC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS.

For peptide analysis by nLC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS, a nanoLC system (Agilent Technologies, 1100 series, Germany) equipped with a Zorbax 300SB-C18 (150 $\text{mm} \times 75 \mu\text{m}$, Agilent Technologies) analytical column and a Zorbax 300SB-C18 (5 \times 0.3 mm, Agilent Technologies) trap column was used. The coupling to the electrospray ionization (ESI) source was done with a conventional needle for nanospray (stainless steel emitters, 40 μm OD 0.025, Thermo Fisher Scientific, S.L.U., Waltham, MA, USA). Positive ionization mode, a transfer capillary temperature of 200 °C, and a spray voltage of 1.7 kV were applied. A chromatographic elution gradient of 35 min (0/10, 5/10, 25/32, 26/90, 29.5/90 expressed as time/%B) at a flow rate of 0.30 $\mu\text{L min}^{-1}$ was used, where mobile phase A was 5 % ACN and 0.1 % formic acid and mobile phase B was 99.9 % ACN and 0.1 % formic acid.

Peptides were scanned and fragmented using a LTQ-Orbitrap analyzer. The MS method consisted on a full scan event at a resolving power of 60,000 over the m/z range from 400 to 1800, followed by data-dependent CID fragmentation events of the five most intense peaks allowing dynamic mass exclusion. Normalized collision energy (NCE) of 35 % was used in the fragmentation events, being the isolation window 5 Da.

For data analysis, cisplatin peptides were manually recognized and identified, taking into account the isotopic patterns both in the high-resolution full scans of the precursor ions and in the MS/MS spectra. A parallel Sequest search introducing the different possible platinum moieties masses as variable modifications was carried out using the MS/MS spectra.

Results and discussion

FASP-assisted tryptic digestion for platinum–protein complexes

Considering the different degrees of stability of cisplatin–, oxaliplatin–, or carboplatin–protein complexes [32], the suitability of FASP-assisted tryptic digestion for the latter two was evaluated, with the aim to compare their behavior and to assess the possibility of extending the use of this digestion procedure, previously investigated for cisplatin, to other platinum drug–protein complexes.

To evaluate the possible losses of platinum along the procedure, HSA, which had been incubated with either oxaliplatin or carboplatin, was trypsin-digested under the FASP procedure and the platinum content in the filtrate fractions after the 1) washing, 2) reducing, and 3) alkylating steps was determined by ICP-MS. The total platinum content found in all the three filtrate fractions and for three replicates was lower than 15 % calculated over the total platinum content measured in the retentate and filtrate fractions. A high platinum–peptide global recovery of 67 ± 2 and 70 ± 3 % was obtained for oxaliplatin– and carboplatin–HSA, respectively.

In order to check if platinum present in the peptide fraction still remained bound to peptides, the digests of either oxaliplatin– or carboplatin–HSA complexes were analyzed by SEC-ICP-MS, and the profiles are shown in Fig. 1a, b (black lines), respectively. Moreover, for comparison purposes, free oxaliplatin or carboplatin incubated for 8 h in NH_4HCO_3 50 mM (that is the medium in which peptides were present) were also shown in Fig. 1a, b (gray lines), respectively. As can be seen in Fig. 1a, b, several platinum species were obtained between 10 and 22 min, indicating the absence or negligible amount of either free or hydrolyzed oxaliplatin or carboplatin (which presents platinum species with retention times approximately between 23 and 32 min).

The application of FASP-assisted tryptic digestion to a mixture of standard proteins that are known to be able to coordinate to cisplatin, oxaliplatin, and carboplatin (HSA, TF, CA, MYO, and CYT c) provided similar recoveries (in the range 55–64 %). The recovery of platinum complexes is similar to that of non-platinated peptides, being such loss mainly due to the sample digestion yield itself [29, 30]. Therefore, platinum–peptide/non-platinated peptide ratio remains the same as if the digestion yield had been 100 % and has no negative impact on the sample preparation. Furthermore, the SEC-ICP-MS profiles also show that platinum present in the peptide fraction still remained bound to peptides. As an example, the digest of oxaliplatin–protein complexes is shown in Fig. 1c (black line).

These results point out that the platinum–protein bonds in cisplatin–, oxaliplatin–, and carboplatin–protein complexes are strong enough to resist the overnight tryptic digestion. Moreover,

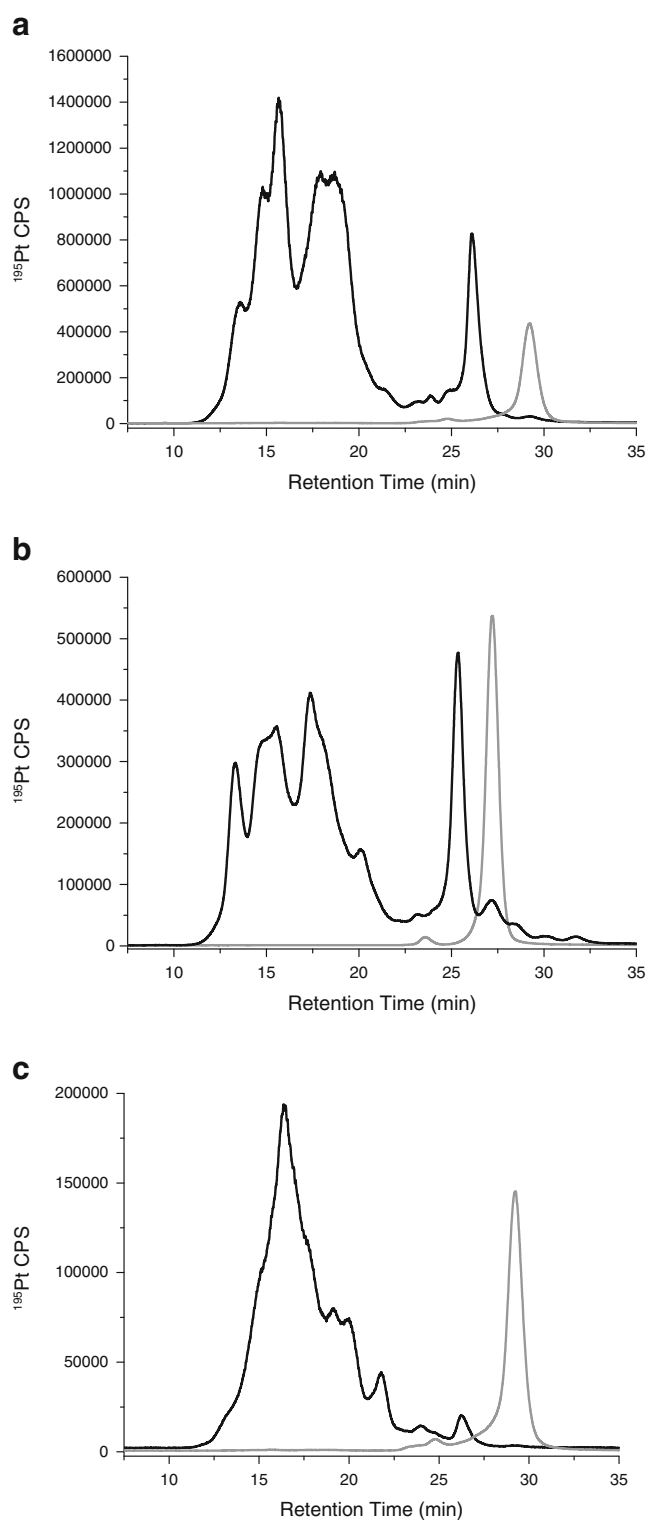


Fig. 1 SEC-ICP-MS chromatograms monitoring ^{195}Pt for **a** oxaliplatin– and **b** carboplatin–peptide complexes (black lines) obtained after the FASP procedure for oxaliplatin–HSA and carboplatin–HSA, respectively; **c** oxaliplatin–peptide complexes (black line) obtained after the FASP procedure for oxaliplatin–protein mixture. Oxaliplatin and carboplatin (10 μM) in NH_4HCO_3 50 mM for 8 h is also indicated in **a**, **b**, and **c** by gray lines

the preservation of the carboplatin–protein bond under the reducing and alkylating conditions of the FASP tryptic digestion is an important finding, demonstrating the suitability of the procedure even in the case of carboplatin, which generates lower concentration platinum–protein complexes due to its limited reactivity as compared to the other drugs [32].

OFFGEL-IEF for the separation of platinum–peptide complexes

The platinum–peptide complexes stability was checked under OFFGEL-IEF separation. With this purpose, standard HSA incubated with cisplatin, oxaliplatin, or carboplatin and further trypsin-digested by the FASP procedure was separated by OFFGEL-IEF. Separated peptides can be recovered from the wells in liquid phase for further processing. Total platinum determination by ICP-MS was performed to evaluate the applicability of the fractionation protocol for platinum–peptide analysis. Figure 2a displays the platinum content in each well

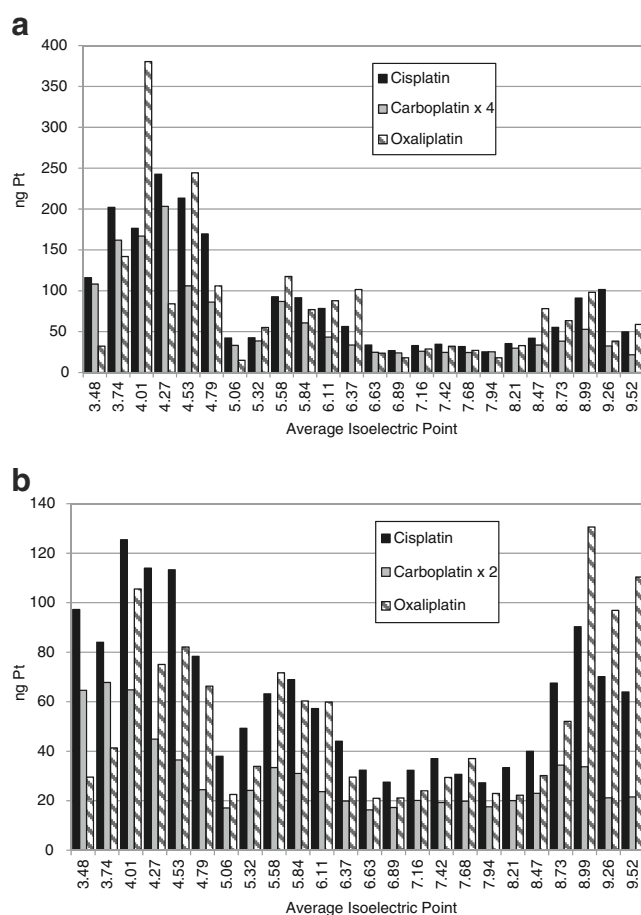


Fig. 2 ICP-MS analysis of the platinum content in the peptide-based OFFGEL-IEF fractions for a tryptic digest of **a** cisplatin-, carboplatin-, and oxaliplatin-HSA and **b** cisplatin-, carboplatin-, and oxaliplatin-protein mixture (HSA, TF, CA, MYO, and CYT c). The separation was performed in 24 fractions using strips with a pH range between 3 and 10. Reproducibility ($n=3$) was in the range 1–7 % for the 24 fractions and the three drugs

for cisplatin (black bars), oxaliplatin (streaked bars), and carboplatin (gray bars) tryptic digests respectively, showing the differential migration of the platinum–peptide complexes and their concentration in each well. Recovery values of 50, 77, and 43 % were obtained for platinum, calculated over the total platinum amount loaded into the OFFGEL-IEF system, for cisplatin-, oxaliplatin-, and carboplatin-HSA, respectively. As can be seen, for all the platinum-based drugs, a high amount of platinum is found mainly in the following fractions (the data in brackets correspond to the expected pH ranges per fraction as indicated by the manufacturer): fraction F1 [3.35–3.61], F2 [3.61–3.88], F3 [3.88–4.14], F4 [4.14–4.40], F5 [4.40–4.66], and F6 [4.66–4.93], which is basically the range in which the majority of tryptic peptides (pH 3.5–5.0) fall. However, lower amounts of platinum were obtained for carboplatin- as compared to cisplatin- or oxaliplatin-peptide complexes (Fig. 2a). This may be attributed to the differences in reactivity observed between cisplatin, oxaliplatin, and carboplatin on their binding upon proteins [29]. For comparison purposes, tryptic digests of a mixture of standard proteins (HSA, TF, CA, MYO, and CYT c) incubated with the three platinum-based drugs were also fractionated by the proposed methodology, providing a platinum recovery value of 56, 84, and 65 % for cisplatin-, oxaliplatin-, and carboplatin-protein mixture, respectively. A similar platinum distribution can be observed as compared to that described earlier for the standard HSA sample for cisplatin-, oxaliplatin-, or carboplatin-peptide complexes (Fig. 2b).

Furthermore, to check if platinum present in each OFFGEL-IEF fraction still remained bound to peptides, the platinum–peptide complexes obtained from each well were analyzed by SEC-ICP-MS. Similar platinum profiles were obtained for the platinum–peptide complexes for the different platinum-based drugs. As an example, Fig. 3a–d shows the chromatograms for selected fractions (wells 2, 6, 22, and 24) for digested cisplatin-HSA. Moreover, the chromatogram for free cisplatin incubated for 8 h in NH_4HCO_3 50 mM is also shown in Fig. 3e for comparison. As can be seen in Fig. 3a–d, several platinum species were obtained between 12 and 28 min, which indicate the absence of free or hydrolyzed cisplatin. The highlighted region between 25 and 45 min corresponds to the elution area for platinum-free species observed on Fig. 3e. Similar SEC-ICP-MS profiles were obtained for the digest of the protein mixture, showing that platinum present in the selected fractions also still remained bound to peptides. As an example, the digest of cisplatin–protein mixture complexes in the selected fractions (wells 1, 3, 4, 10, and 22) is shown in Electronic Supplementary Material Figure S1a–e. Parallel experiments carried out with a tryptic digest of human blood serum incubated with cisplatin led to similar platinum recoveries and SEC-ICP-MS profiles for the cisplatin–peptide complexes in the selected fractions (data not shown).

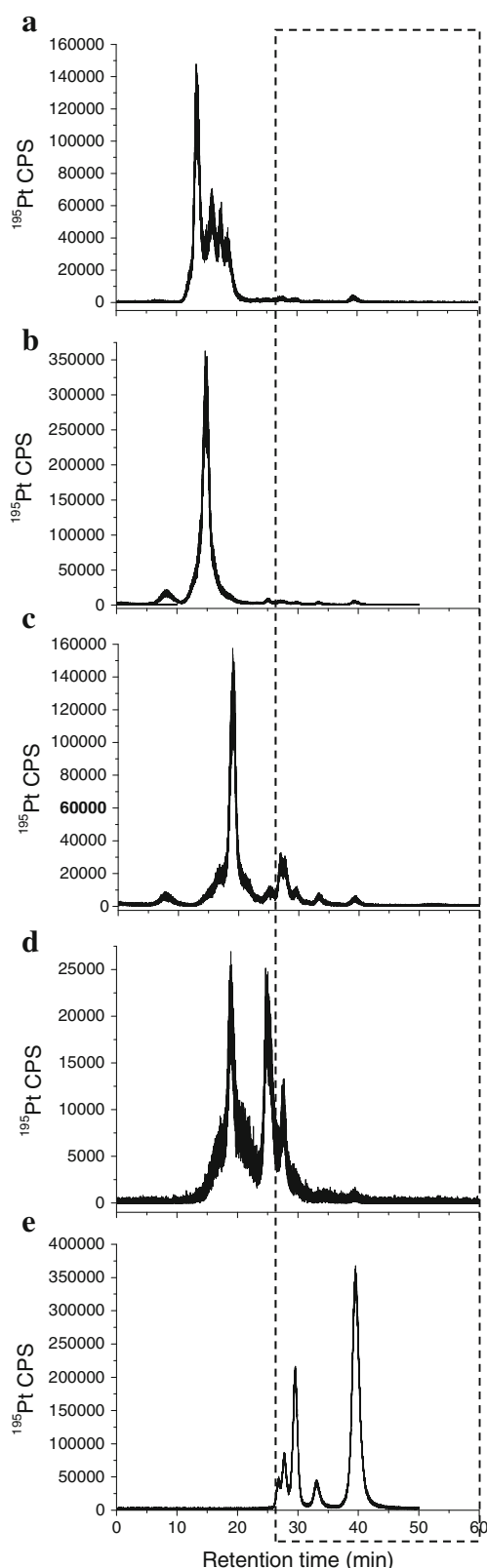


Fig. 3 SEC-ICP-MS chromatograms monitoring ^{195}Pt for cisplatin-peptide complexes from **a** well 2, **b** well 6, **c** well 22, **d** well 24 obtained after the peptide-based OFFGEL-IEF for cisplatin-HSA, and **e** cisplatin in 50 mM NH_4HCO_3 for 8 h. Chart with dashed line indicates the elution area of the platinum-free species

Therefore, it can be concluded that peptide-based OFFGEL-IEF is suitable for the separation of platinum-peptide complexes, allowing for the three platinum-based drugs the preservation of the platinum-peptide bonds. As a selected case study, further work was carried out for cisplatin-HSA complexes, which present relevant clinical implications due to the fact that this drug is intravenously administrated, and this complex acts as storage of the drug in blood plasma.

Detection of platinum-peptide complexes in OFFGEL-IEF fractions and identification of cisplatin-binding sites on HSA by nLC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS

Selected OFFGEL-IEF peptide fractions for cisplatin-HSA digests with the highest amount of platinum (fractions F1-F6) were analyzed by nLC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS. By comparing the resulting total ion current (TIC) chromatograms for the cisplatin-HSA tryptic digest before and after the separation step for the MS analysis (data not shown), it can be concluded that the proposed methodology allows the separation of the peptides into several simplified OFFGEL-IEF fractions, which could facilitate further nLC-MS detection of platinum-containing peptide ions.

In order to locate the platinum-containing peptides, further Sequest search of the MS/MS spectra acquired for the selected fractions was carried out according to Will et al. [33, 34], who introduced on the search engine different possible platinum moieties masses as variable modifications. However, no peptides containing platinum could be found in the selected fractions with a Sequest score above the identity threshold. This fact could be due to a number of factors contributing to low scoring: 1) The defective automated recognition of the monoisotopic mass of a precursor peptide ion with a complex isotopic pattern such as that modified with cisplatin. 2) The extreme complexity of the fragmentation pattern involved in platinum-peptide complexes which is not expected in a search engine for conventional proteins. These platinum-protein complexes may involve multiple simultaneous/alternative coordination sites, leading to either certain partial impairment of the expected fragmentation pathways in the ions series or several families of platinated and unplatinated fragments belonging to the different possible binding sites. Importantly, during the fragmentation, in the platinated series, we have observed a clear tendency for the loss of NH_3 ligands originally present in the precursor platinum-peptide ions, which Sequest is not able to recognize in the fragments assignment. 3) Possible co-fragmentation of other species in a wide fragmentation window required for maintaining the platinum isotopic pattern in the fragments. 4) The low intensity presented in some cases by the platinum-peptide ions. All these factors lead to the impossibility of computing a score significantly over the usual threshold of fragmented platinum peptide ions, impairing the automated identification of such complexes. In addition, the

recognition of possible platinum peptides from different protein domains cross-linked by platinum with an automated search engine is not possible. Consequently, the search was carried out by manual inspection of the full MS spectra on the basis of the characteristic isotopic pattern of platinated peptides. As a result of that, several platinum-containing peptide ions were identified in the full MS spectra. An example is shown, which corresponds to fraction F5 and retention time interval between 10.5 and 11.5 min in the chromatograms (Fig. 4a). For comparison purposes, the same retention time region was selected for the non-prefractionated digest (Fig. 4b). It can be seen that,

in Fig. 4a, only two ions dominate the spectrum with high abundance signals: m/z 469.4541 (4+) and 625.6032 (3+), with a characteristic isotopic pattern for platinum-modified peptides (Fig. 4c, d, respectively). However, the same platinated ions could be hardly distinguished from the background noise in the non-prefractionated digest (Fig. 4b, denoted with filled circles), with a low relative abundance signal (<5 %), while the rest of the ions observed in the same spectrum correspond to non-platinated peptides.

Table 1 summarizes the platinum-modified peptides located and identified using the nLC-MS/MS spectra of a cisplatin–

Fig. 4 Full MS spectra for both **a** OFGEL fraction F5 and **b** non-prefractionated cisplatin–HSA digest taken at the retention time region 10.5–11.5 min of the TIC chromatogram. Zoom scan MS of the platinated precursor ion at m/z **c** 469.95 and **d** 626.27 respectively

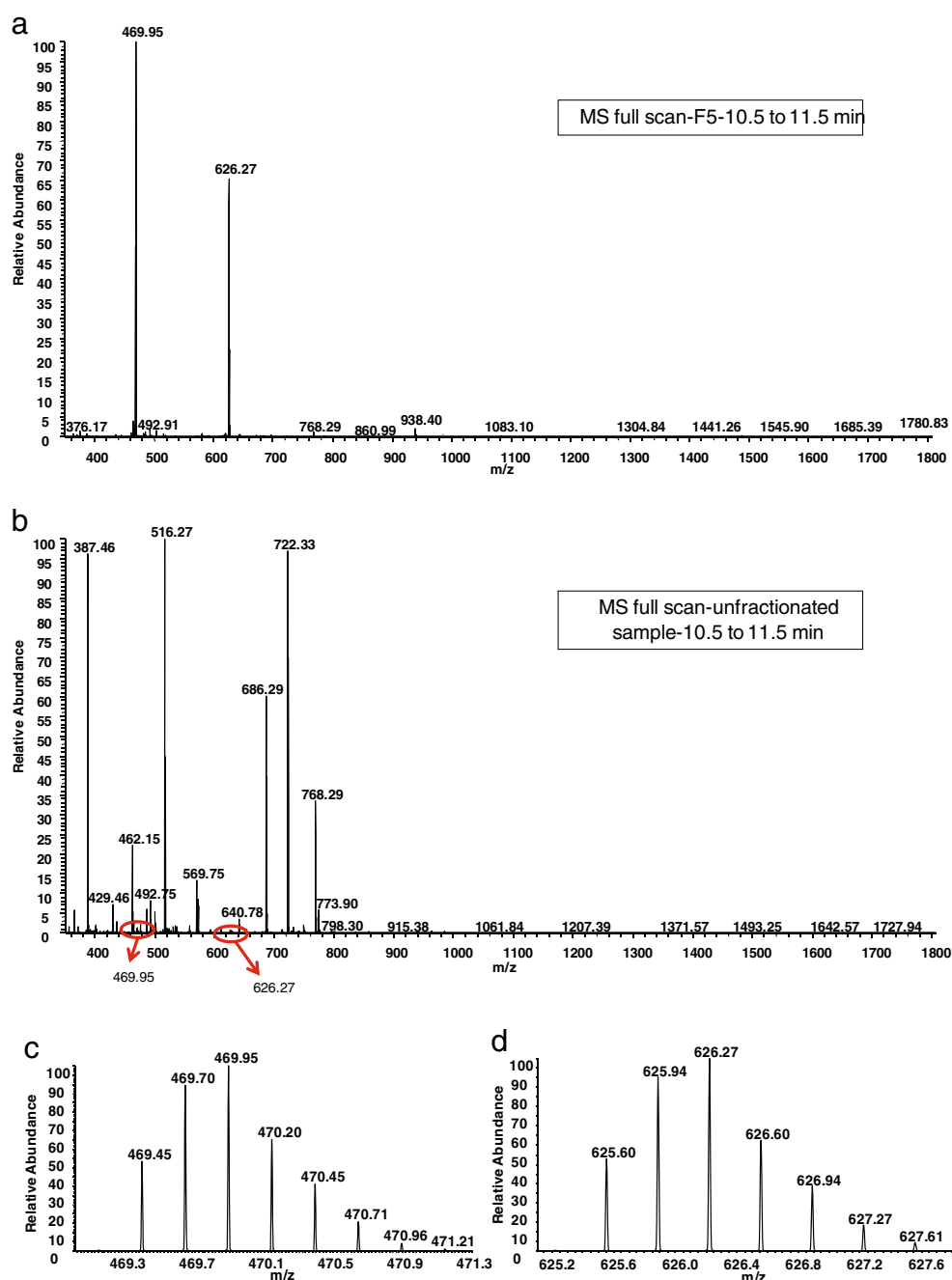


Table 1 List of platinated peptide ions located by nLC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS in a cisplatin-HSA tryptic digest after OFFGEL-IEF

<i>m/z</i>	Charge	Theoretical pI value	Fraction number (pI interval)
796.5864	4	3.95	1 (3.35–3.61) 2 (3.61–3.88)
1061.7786	3	3.95	
800.8424	4	3.95	
699.2788	4	4.51	5 (4.40–4.66)
703.5358	4	4.51	
455.5420	3	6.46	
469.4541	4	4.83	
625.6032	3	4.83	
666.6803	5	4.86	5 (4.40–4.66) 6 (4.66–4.93)
833.0985	4	4.86	
712.0565	4	4.90	
766.3363	5	4.88	6 (4.66–4.93)
957.6678	4	4.88	
600.2746	5	4.50	
750.0910	4	4.50	
598.2702	5	4.90	
601.6733	5	4.90	
605.0784	5	4.90	

Charge, Δ ppm, theoretical pI values, and fraction number are detailed

HSA tryptic digest after fractionation by peptide-based OFFGEL-IEF. It can be seen that platinum-peptides could be found in the fractions F1, F2, F5, and F6. Moreover, it has to be pointed out that most of the peptides were only identified in unique wells, which indicate that peptides are correctly resolved, as

was earlier reported in the literature [35]. Moreover, it should be also noted that experimental pI values for cisplatin-peptides are shifted toward more acidic pIs with respect to unplatinated peptide theoretical pI values, which were calculated by means of a web-based bioinformatics tool [36]. In a previous work [15], we also reported a similar pI drift for the complex between cisplatin and a mixture of standard proteins that were separated under denaturing and non-reducing protein-based OFFGEL-IEF. The utility of this method was also evaluated in more complex samples containing HSA. The same platinum-modified peptides shown in Table 1 were also found in the MS spectra of both the cisplatin-protein mixture and the human blood serum digests on the same IEF fractions indicated above.

The identification of cisplatin-binding sites on the HSA was carried out by manually sequencing the fragmentation spectra of the species shown in Table 1. Identified peptides (mass error lower than 2 ppm in all cases) are displayed in Table 2, and the MS² spectra of their precursor ions 1061.7886 (3+), 703.5358 (4+), 455.5420 (3+), 712.0565 (4+), and 600.2746 (5+) are shown in Electronic Supplementary Material Figures S2–S6, respectively. It is important to highlight the following identifications: (i) two different peptides binding simultaneously to platinum and (ii) the identification of an intra-chain bidentate platinum dipeptide complex. In the first case, according to the fragmentation spectrum of the 469.4541 (4+) precursor ion (Fig. 5), the sequence was elucidated as [⁵SEVAHR¹⁰ + Pt(NH₃)₂ + ¹³DLGEENFK²⁰]. Considering the *b* and *y* ions observed, we could conclude that platinum is coordinated to H9 and the N-terminal of D13. In the second

Table 2 List of identified peptides for cisplatin-HSA by nLC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS

Peptide sequence	<i>m/z</i>	Charge	Δ ppm	Binding site	Pt fragment mass ^a	Fraction number
SHC*IAEVENDE <u>MP</u> ADLPSLAADFVESK	796.5864	4	1.75	M298	210	1, 2
SHC*IAEVENDE <u>MP</u> ADLPSLAADFVESK	1061.7786	3	1.03	M298	210	1, 2
SHC*IAEVENDE <u>MP</u> ADLPSLAADFVESK	800.8424	4	0.99	M298	227	1, 2
VHTEC*C* <u>H</u> GDLLEC*ADDRADLAK	699.2788	4	0.72	H247	210	5
VHTEC*C* <u>H</u> GDLLEC*ADDRADLAK	703.5358	4	1.27	H247	227	5
SL <u>H</u> TLFGDK	455.5420	3	0.88	H67	348	5
SEVA <u>H</u> R- <u>D</u> LGEENFK	469.4541	4	1.06	H9 + D13	227	5
SEVA <u>H</u> R- <u>D</u> LGEENFK	625.6032	3	1.28	H9 + D13	227	5
SL <u>H</u> TLFGDK-VHTEC*C* <u>H</u> GDLLEC*ADDR	666.6803	5	1.64	H67 + H247	227	5, 6
SL <u>H</u> TLFGDK-VHTEC*C* <u>H</u> GDLLEC*ADDR	833.0985	4	1.56	H67 + H247	227	5, 6
QEPERNEC*FLQ <u>H</u> KDDNPPLPR	712.0565	4	1.26	H105	210	5, 6
SL <u>H</u> TLFGDK-VHTEC*C* <u>H</u> GDLLEC*ADDRADLAK	766.3363	5	1.43	H67 + H247	227	6
SL <u>H</u> TLFGDK-VHTEC*C* <u>H</u> GDLLEC*ADDRADLAK	957.6678	4	0.63	H67 + H247	227	6
LVRPEVDVMC*TAF <u>H</u> DNEETFLK	600.2746	5	1.99	H128	348	6
LVRPEVDVMC*TAF <u>H</u> DNEETFLK	750.0910	4	1.33	H128	348	6
LVRPEVDVMoxC*TAF <u>H</u> DNEETFLKK	601.6733	5	0.66	H128	210	6
LVRPEVDVMoxC*TAF <u>H</u> DNEETFLKK	605.0784	5	0.33	H128	227	6

The assigned binding sites are designated in bold and underlined in the amino acid sequence

^a {Pt}²⁺ = 193, {Pt(NH₃)₂}²⁺ = 210, {Pt(NH₃)₂}²⁺ = 227, {Pt(NH₃)₂Tris}²⁺ = 348

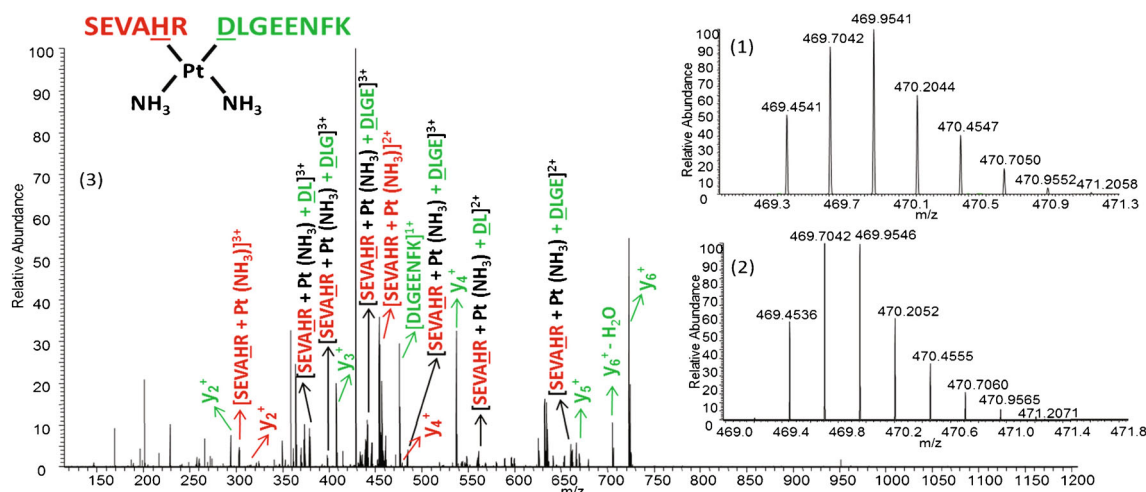


Fig. 5 CID-MS/MS spectrum of the platinum-containing peptide ion at m/z 469.45 (4+), corresponding to $[^5\text{SEVAHR}^{10} + \text{Pt}(\text{NH}_3)_2 + ^{13}\text{DLGEENFK}^{20}]^{4+}$. (1) Zoom scan MS of the platinated experimental precursor

ion; (2) zoom scan MS of the platinated theoretical precursor ion; (3) MS² fragmentation spectrum. The assigned binding site is designated by the underlined letter in the amino acid sequence

one, the fragmentation spectra of the 666.6803 (5+) ion (Fig. 6) allows identifying the sequence as $[^6\text{SLHTLFGDK}^{73} + \text{Pt}(\text{NH}_3)_2 + ^{241}\text{VHTEC}^*\text{C}^*\text{HGDLLEC}^*\text{ADDR}^{257}]^{5+}$, which reveals several unplatinated y^+ ions from both independent peptides. On the other hand, the b_3^+ ion from the SLHTLFGDK peptide was observed, which confirmed H67 as binding site. Moreover, several platinated peptides were observed bridging the two different peptides. The ion obtained at m/z 533.9656 (4+), identified as $[^6\text{SLHTLFGDK}^{73} + \text{Pt}(\text{NH}_3)_2 + ^{241}\text{VHTEC}^*\text{C}^*\text{H}^{247}]^{4+}$, allowed the confirmation of H247 as the second platinum-binding residue.

We can conclude that the proposed methodology has allowed identifying from the MS/MS spectra most of the binding sites located at the HSA surface accessible to cisplatin (five histidines (H9, H67, H105, H128, and H247) and two methionines (M298 and M329), as well as the N-terminal

from the residue D13) in contrast with the limited number of platinum-binding sites that have been previously characterized unambiguously by several authors using different experimental designs [2, 16, 33, 34, 37]. The binding sites located in this work are in agreement with the surface accessibilities of cisplatin in HSA which were obtained by a web-based bioinformatics tool [38], revealing that HSA has a limited amount of binding sites on its surface: 12 His (six of them highly accessible), 4 Met (being M298 and M329 the most highly accessible), and 1 Cys (with a free thiol, C34). Moreover, this is due to the considerable affinity of platinum (II) for the imidazole nitrogens of histidine or the thioether sulfur in methionine as was earlier reported [2]. Furthermore, it is important to remark that the proposed methodology also allows revealing that cisplatin can cross-link residues H67 of domain I and H247 of domain II in HSA. This finding was recently

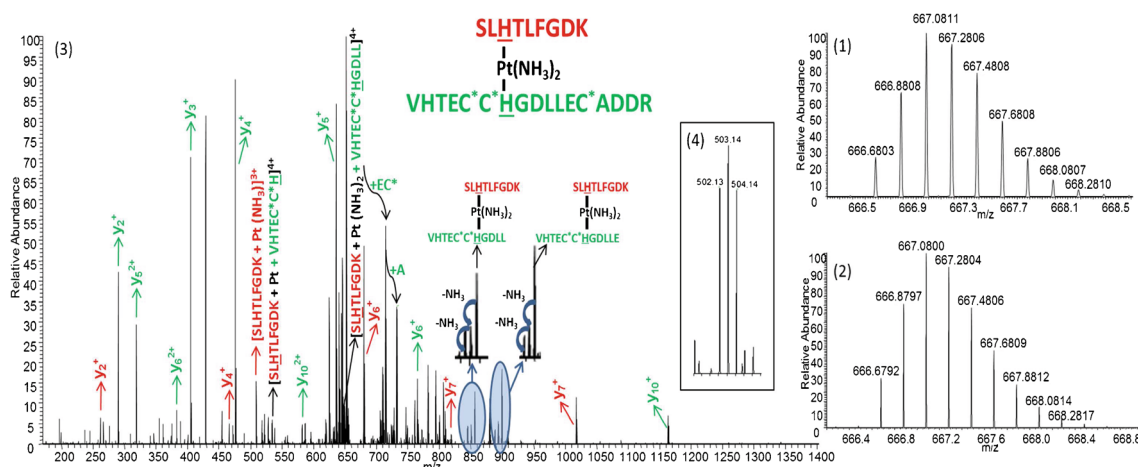


Fig. 6 CID-MS/MS spectrum of the platinum-containing peptide ion at m/z 666.68 (5+), corresponding to $[^6\text{SLHTLFGDK}^{73} + \text{Pt}(\text{NH}_3)_2 + ^{241}\text{VHTEC}^*\text{C}^*\text{HGDLLEC}^*\text{ADDR}^{257}]^{5+}$. (1) Zoom scan MS of the platinated experimental precursor ion; (2) zoom scan MS of the platinated

theoretical precursor ion; (3) MS² fragmentation spectrum; (4) b_3^+ platinated ion. The assigned binding site is designated by the underlined letter in the amino acid sequence

reported for the first time by Hu et al. [39], demonstrating that the mode of action of this drug is not well understood, and precise identification of all binding sites is needed. This finding has relevant physiological implications for the cause of abnormalities in zinc levels reported for patients undergoing cisplatin therapy since this is the major binding site in the protein for the essential metal zinc [40].

Conclusions

A shotgun approach comprising FASP tryptic digestion in combination with peptide-based OFFGEL-IEF and nLC-ESI-LTQ-Orbitrap-MS/MS is revealed as an attractive alternative to other previous protein separation-based approaches for the analysis of platinum–protein complexes. The proposed methodology maintains the integrity of platinum complexes throughout all the procedure and makes possible the identification of platinum–proteins in complex biological samples. The fact that each IEF fraction contains a simplified mixture of peptides enables the identification of more peptides by LC-MS/MS including those of lower abundance and lower ionization efficiency, such as platinum-containing peptides. This methodology is also promising for other metalloproteome analyses in biological samples, where metal–protein complexes stability and relative abundance can be an issue. Furthermore, it may be also compatible to chemical labeling approaches for quantitative proteomics, such as iTRAQ. However, the application of search engines for the high-throughput automatized identification of platinated peptides still needs to be improved in order to extend the scope of the proposed methodology to biological samples containing clinical amounts of platinum-based drugs.

Acknowledgments This work was financially supported by the Ministry of Economy and Competitiveness of Spain (CTQ2011-24585). The authors want to thank Ulf Bergmann and Boris Neumann for the useful discussions and to Proteome Factory AG for the instrumental and technical support. E.M. acknowledges the European Commission for a Marie Curie IEF fellowship. I. Moraleja also acknowledges Universidad Complutense de Madrid for a predoctoral fellowship.

References

- Sahni V, Choudhury D, Ahmed Z (2009) *Nat Rev Nephrol* 8:450–462
- Moreno-Gordaliza E, Cañas B, Palacios MA, Gómez-Gómez MM (2012) *Talanta* 88:599–608
- Esteban-Fernández D, Moreno-Gordaliza E, Cañas B, Palacios MA, Gómez-Gómez MM (2010) *Metallomics* 2:19–38
- Righetti PG, Castagna A, Herbert B, Reymond F, Rossier JS (2003) *Proteomics* 3:1397–1407
- Bailey J, Mrozinski P, Preckel T, Miller C, Martosella J, Kincaid R (2006) *Curr Trends Mass Spectrom* 11:16–21
- Görg A, Weiss W, Dunn MJ (2004) *Proteomics* 4:3665–3685
- Rabilloud T (2002) *Proteomics* 2:3–10
- Domon B, Aebersold R (2006) *Science* 312:212–217
- Ros A, Faupel M, Mees H, van Oostrum J, Ferrigno R, Reymond F, Michel P, Rossier JS, Girault H (2002) *Proteomics* 2:151–156
- Michel PE, Reymond F, Arnaud IL, Josserand J, Girault HH, Rossier JS (2003) *Electrophoresis* 24:3–11
- Han M, Herlyn M, Fisher AB, Speicher DW (2008) *Electrophoresis* 29:695–705
- Myung JK, Lubec G (2008) *J Proteome Res* 5:1267–1275
- Shang TQ, Ginter JM, Johnston MW, Larsen BS, McEwen CN (2003) *Electrophoresis* 24:2359–2368
- Pioselli B, Munro C, Raab A, Deitrich CL, Songsrirote K, Feldmann J, Thomas-Oates J (2009) *Metallomics* 1:501–510
- Mena ML, Moreno-Gordaliza E, Moraleja I, Cañas B, Gómez-Gómez MM (2011) *J Chromatogr A* 1218:1281–1290
- Moraleja I, Moreno-Gordaliza E, Mena ML, Gómez-Gómez MM (2014) *Talanta* 120:433–442
- Cargile BJ, Talley DL, Stephenson JL Jr (2004) *Electrophoresis* 24:936–945
- Pernemalm M, De Petris L, Eriksson H, Branden E, Koyi H, Kanter L, Lewensohn R, Lehtio J (2009) *Proteomics* 9:3414–3424
- McQuade LR, Schmidt U, Pascovici D, Stojanov T, Baker MS (2009) *J Proteome Res* 8:5642–5649
- Sutton CW, Rustogi N, Gurkan C, Scally A, Loizidou MA, Hadjisavvas A, Kyriacou K (2010) *J Proteome Res* 9:3891–3902
- Petrak J, Pospisilova J, Sedinova M, Jedelsky P, Lorkova L, Vit O, Kolar M, Strnad H, Benes J, Sedmera D, Cervenka L, Melenovsky V (2011) *Proteome Sci* 9:69–73
- Renato M, Cinzia F, Paolo T, Rita P, Daniela C, Giorgio A (2013) *J Chromatogr A* 1293:1–9
- Di Palma S, Hennrich ML, Hech AJR, Mohammed S (2012) *J Proteome* 75:3791–3813
- Hubner NC, Ren S, Mann M (2008) *Proteomics* 8:4862–4872
- Elschenbroich SE, Ignatchenko V, Sharma P, Schmitt-Ulms G, Gramolini AO, Kislinger T (2009) *J Proteome Res* 8:4860–4869
- Moreno-Gordaliza E, Esteban-Fernández D, Giesen G, Lehmann K, Lázaro A, Tejedor A, Scheler C, Cañas B, Jakubowski N, Linscheid NM, Gómez-Gómez MM (2012) *J Anal At Spectrom* 27:1474–1483
- Becker JS, Mounicou S, Zoriy MV, Becker JS, Lobinski R (2008) *Talanta* 76:1183–1188
- Williams KR, Stone KL (1997) *Mol Biotechnol* 8:155–159
- Manza LL, Stamer SL, Ham AL, Codreanu SJ, Liebler DC (2005) *Proteomics* 5:1742–1745
- Wisniewski JR, Zielinska DF, Mann M (2011) *Anal Biochem* 410:307–309
- Liebler DC, Ham AL (2009) *Nat Methods* 6:785–786
- Mena ML, Moreno-Gordaliza E, Gómez-Gómez MM (2013) *Talanta* 120:433–442
- Will J, Sheldrick WS, Wolters D (2008) *J Biol Inorg Chem* 13:421–434
- Will J, Wolters DA, Sheldrick WS (2008) *Chem Med Chem* 3:1696–1707
- Lam HT, Josserand J, Lion N, Girault HH (2007) *J Proteome Res* 6:1666–1676
- Scansite 3 Webservice (Calculate molecular weight and isoelectric point) (2014). <http://scansite.mit.edu/calc.mw.pi.html>. Accessed 14 Oct 2014
- Ivanov AI, Christodoulou J, Parkinson JA, Barnham KJ, Tucker A, Woodrow J, Sadler PJ (1998) *J Biol Chem* 273:14721–14730
- Center for Informational Biology (2014). Accessible surface area and accessibility calculation for protein. Ochanumizu University, Otsuka, Bunkyo, Tokio, Japan. <http://scansite.mit.edu/calc.mw.pi.html>. Accessed 14 Oct 2014
- Hu W, Luo Q, Wu K, Li X, Wang F, Chen Y, Ma X, Wang J, Liu J, Xiong S, Sadler PJ (2011) *Chem Commun* 47:6006–6008
- Sweeney JD, Ziegler P, Pruet C, Spaulding MB (1989) *Cancer* 63:2093–2095

Analytical and Bioanalytical Chemistry

Electronic Supplementary Material

A shotgun approach for the identification of platinum–protein complexes

Irene Moraleja, Estefanía Moreno-Gordaliza, Diego Esteban-Fernández, M.Luz Mena, Michael W. Linscheid and M. Milagros Gómez-Gómez

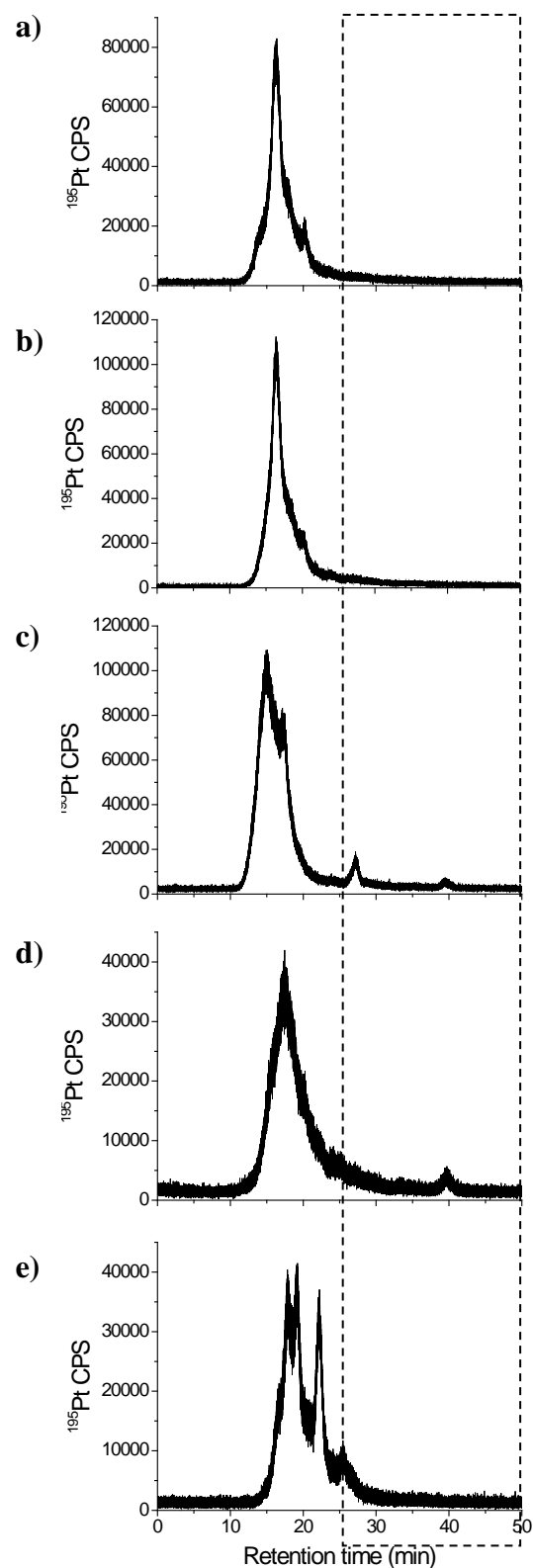


Fig. S1 SEC–ICP–MS chromatogram monitoring ^{195}Pt for cisplatin–peptide complexes from (a) well 1, (b) well 3, (c) well 4, (d) well 10 and (e) well 22 obtained after the peptide–based OFFGEL–IEF for the cisplatin –proteins mixture. Chart with dash line indicates the elution area of the platinum-free species

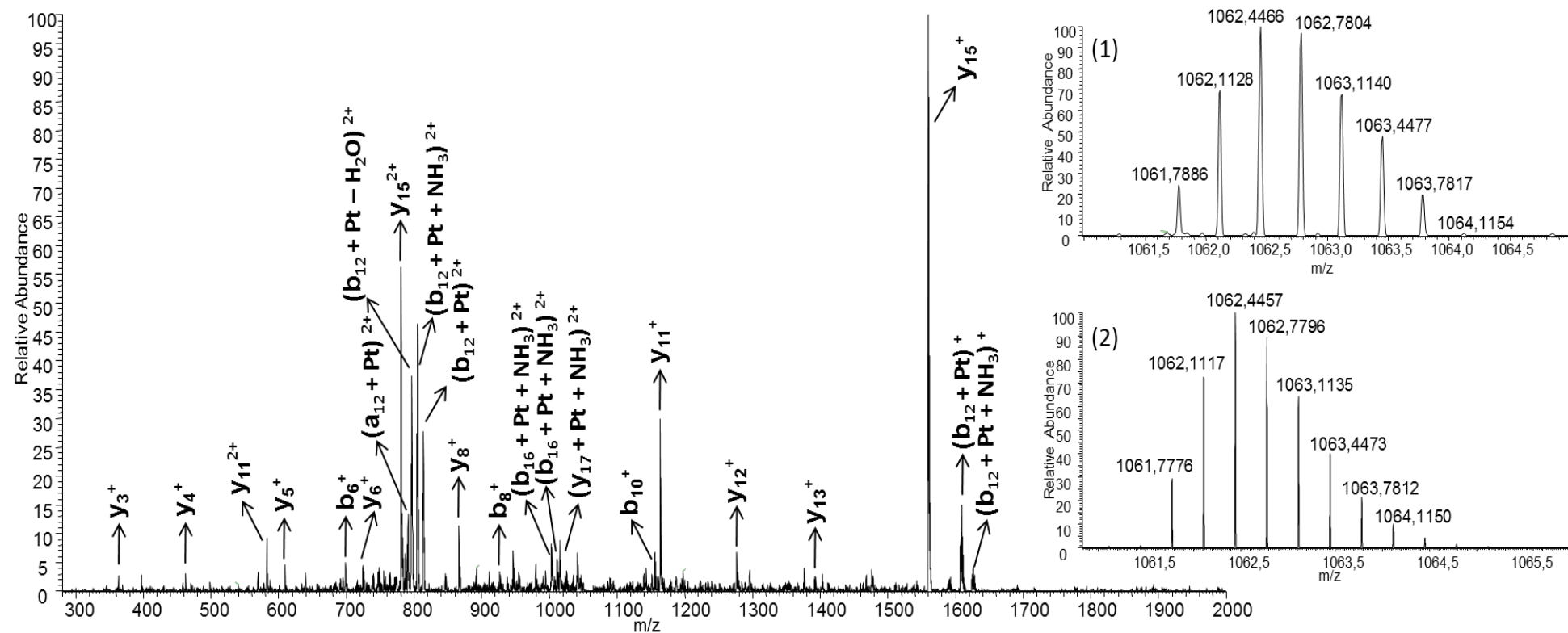


Fig. S2 CID-MS/MS spectrum of the platinum-containing peptide ion at m/z 1061.78 (3+). Inset: (1) Zoom scan MS of the platinated experimental precursor ion; (2) Zoom scan MS of the platinated theoretical precursor ion. M represents the platinum binding site

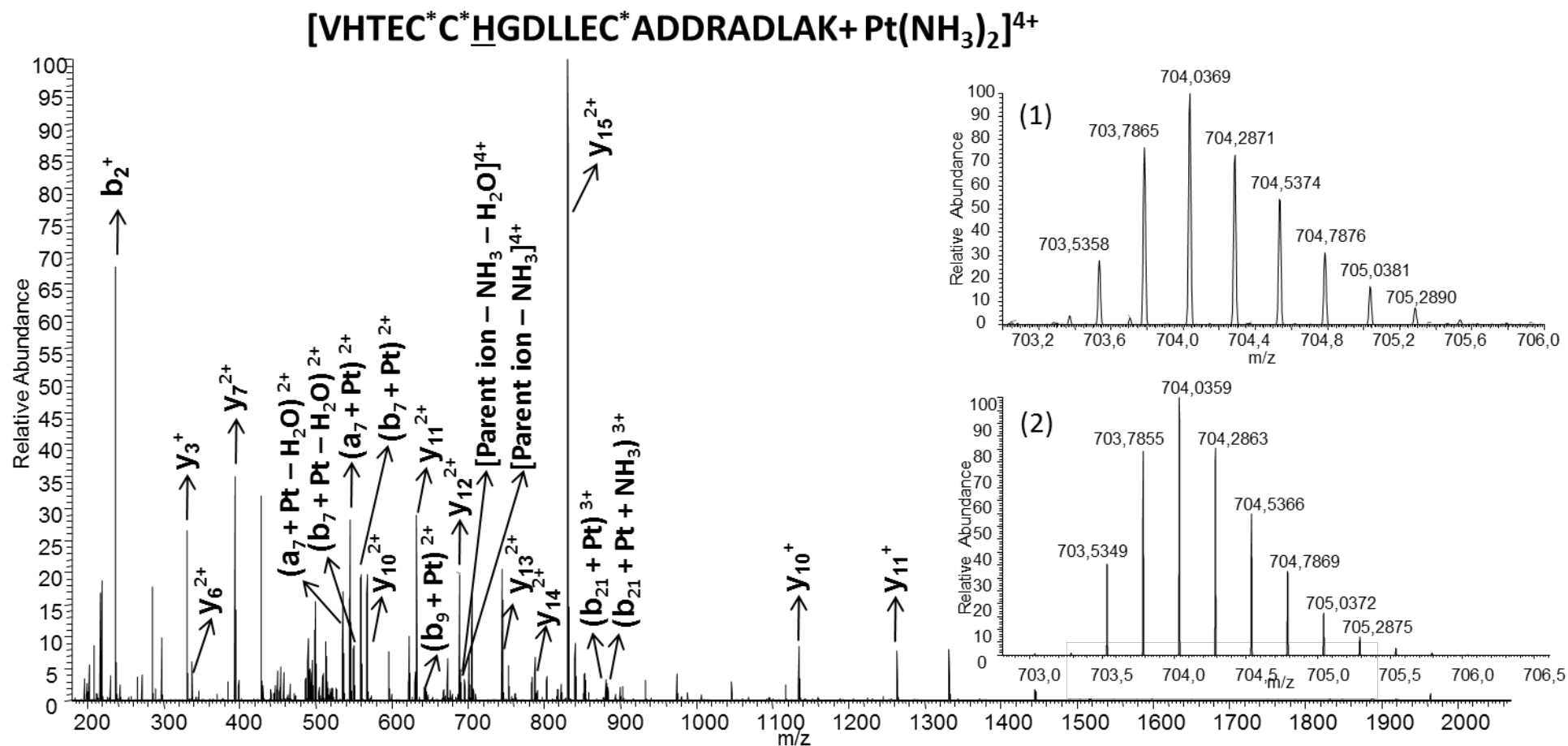


Fig. S3 CID-MS/MS spectrum of the platinum-containing peptide ion at m/z 703.54 (4+). Inset: (1) Zoom scan MS of the platinated experimental precursor ion; (2) Zoom scan MS of the platinated theoretical precursor ion. H represents the platinum binding site

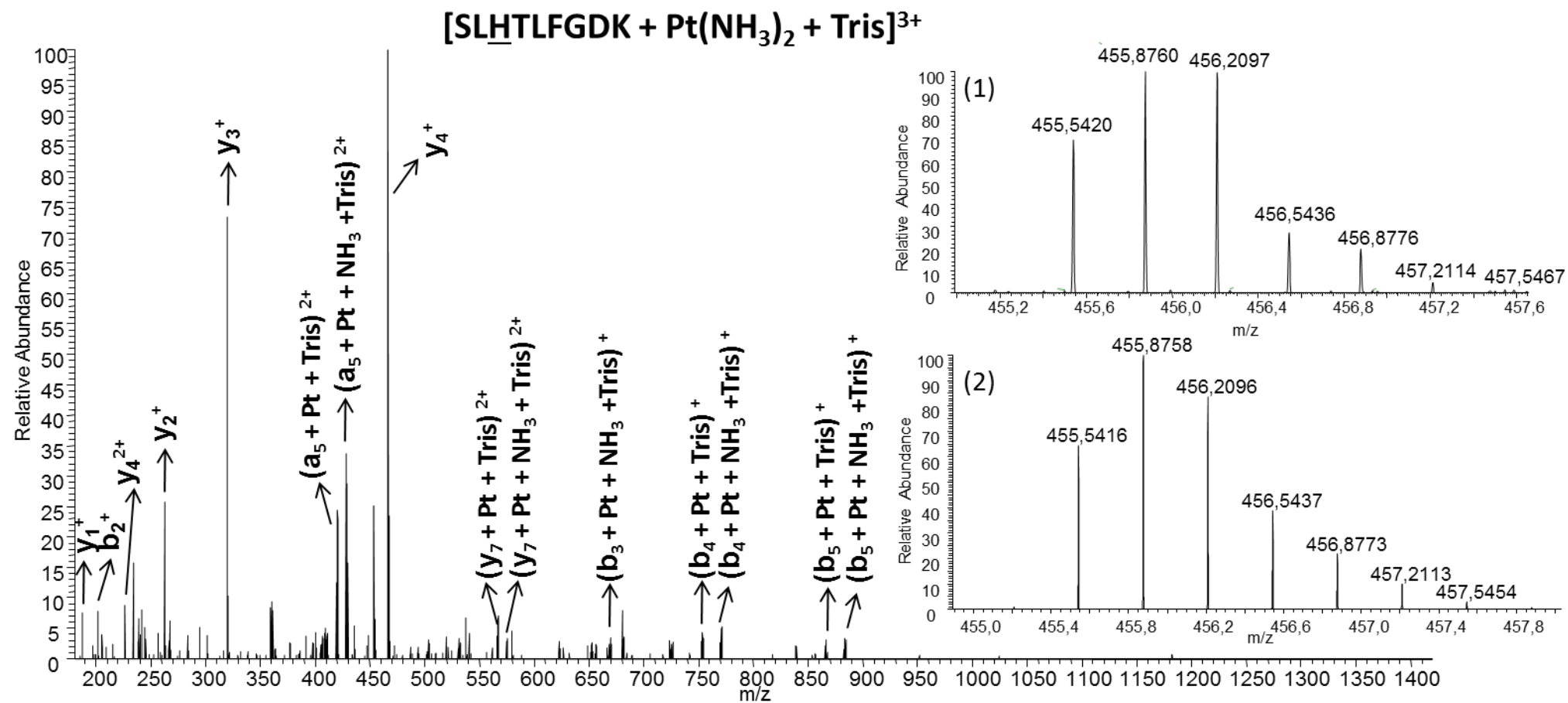


Fig. S4 CID-MS/MS spectrum of the platinum-containing peptide ion at m/z 455.54 (3+). Inset: (1) Zoom scan MS of the platinated experimental precursor ion, (2) Zoom scan MS of the platinated theoretical precursor ion. H represents the platinum binding site

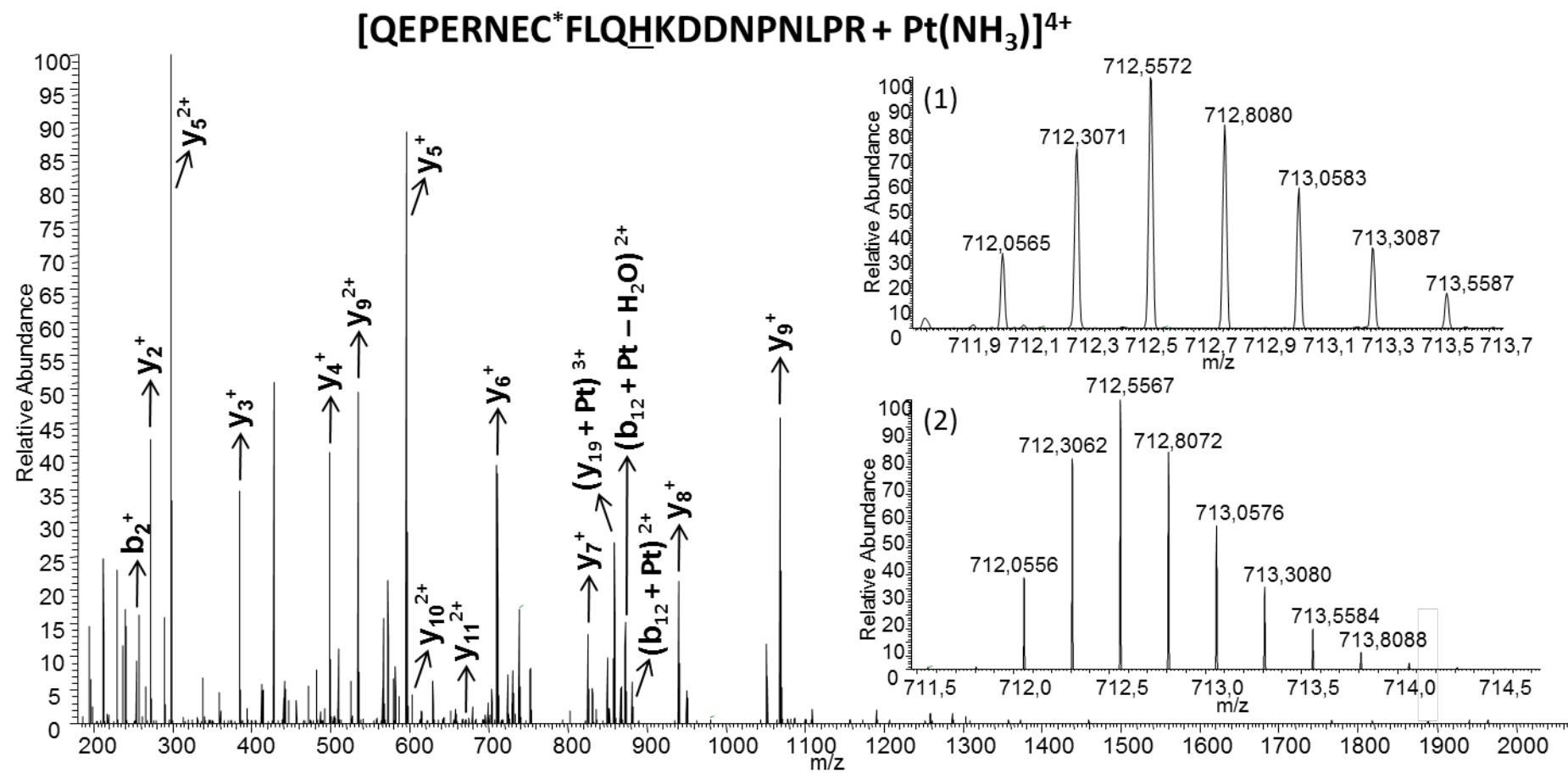


Fig. S5 CID-MS/MS spectrum of the platinum-containing peptide ion at m/z 712.06 (4+). Inset: (1) Zoom scan MS of the platinated experimental precursor ion; (2) Zoom scan MS of the platinated theoretical precursor ion. H represents the platinum binding site

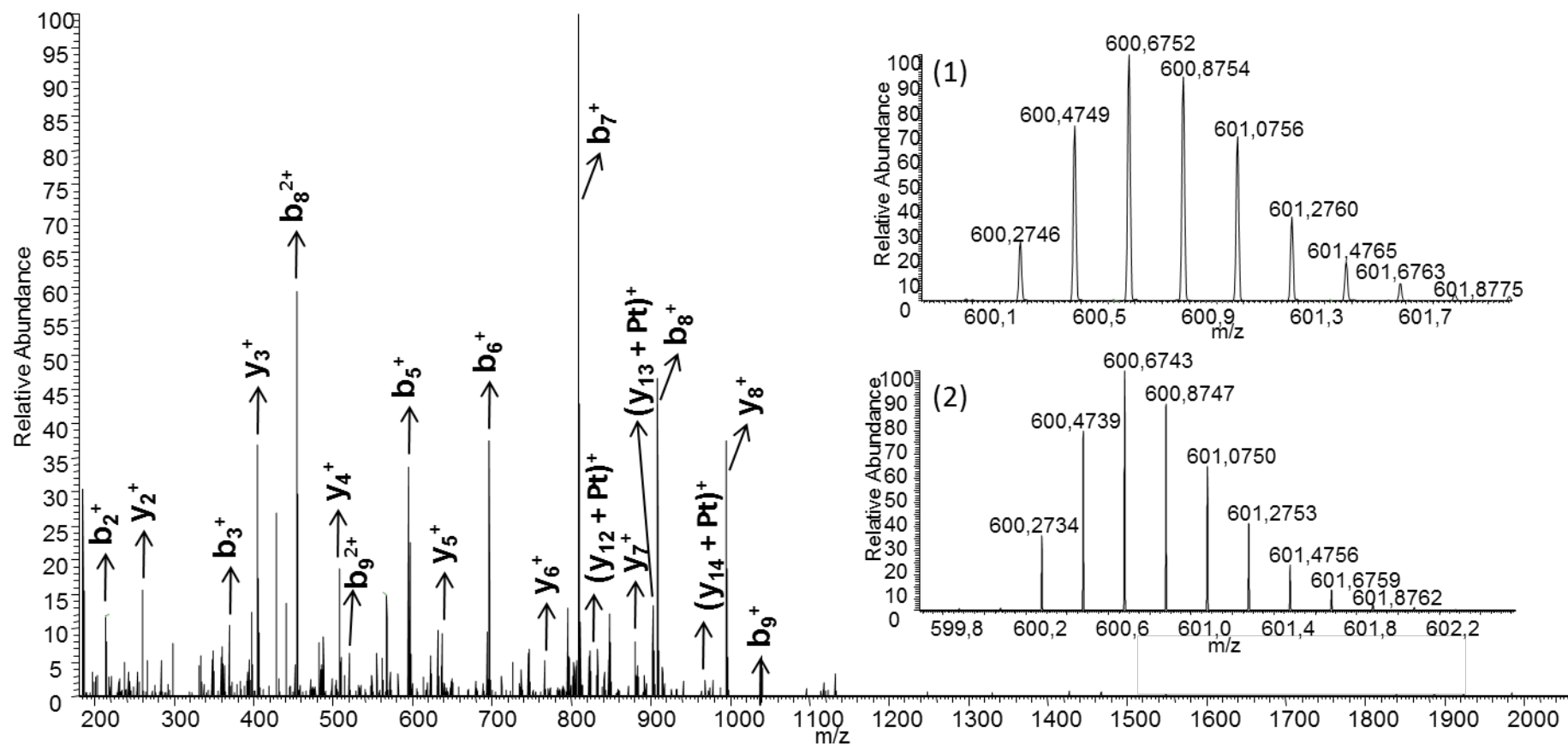


Fig. S6 CID–MS/MS spectrum of the platinum–containing peptide ion at m/z 600.27 (5+). Inset: (1) Zoom scan MS of the platinated experimental precursor ion; (2) Zoom scan MS of the platinated theoretical precursor ion. M represents the platinum binding site

PARTE EXPERIMENTAL

1.2. Obtención de iones marcadores específicos de metales mediante MS molecular para la localización e identificación de proteínas ligadas a Pt en muestras biológicas

185

Una vez desarrolladas las metodologías de fraccionamiento de muestras complejas que permitan la simplificación de las mismas y la separación de los complejos que forman los fármacos antitumorales de Pt con las proteínas renales, el siguiente paso consiste en la identificación de las mismas, lo cual permitiría evaluar los mecanismos moleculares de nefrotoxicidad. En este punto, como se ha comentado en la sección anterior, es necesario recurrir al empleo de estrategias modernas de bioanálisis basadas en técnicas de espectrometría de masas (MS) atómicas y moleculares de alta resolución. En las últimas décadas, el gran desarrollo que han experimentado las técnicas de MS ha mejorado significativamente el desarrollo de diferentes áreas de la Química. Sirva de ejemplo la proteómica, que ha experimentado un gran cambio gracias al desarrollo de, entre otros, las fuentes de ionización blanda. En este punto, ha sido posible el análisis de péptidos con un alto rendimiento, lo que ha permitido la secuenciación de proteínas y su posterior identificación mediante el empleo de motores de búsqueda y bases de datos.

Sin embargo, en el caso de la metalómica en general y de las proteínas ligadas a Pt en particular, el perfil isotópico característico que presenta dicho elemento produce una modificación en el perfil isotópico de los péptidos si lo comparamos con los espectros de masas obtenidos en la proteómica clásica, lo que dificulta enormemente

la identificación de las proteínas empleando los motores de búsqueda y bases de datos tradicionales. Es por ello que el objetivo de esta sección se centró en desarrollar una nueva estrategia de análisis por MS que permitiera la fácil localización e identificación de proteínas modificadas con Pt.

En el trabajo 5 (**"Bridging the gap between molecular and elemental mass spectrometry: higher energy collisional dissociation (HCD) revealing elemental information"** *Analytical Chemistry* (2015) 87, 1613-1621) las medidas instrumentales se realizaron durante dos estancias realizadas en el contexto de esta tesis doctoral en la Humboldt Universitaet zu Berlin, en el grupo del Prof. Dr. Michael W. Linscheid, y en colaboración con la empresa Proteome Factory AG de Berlín. En este trabajo se ha estudiado la posibilidad de obtener información elemental y molecular de forma simultánea en un mismo análisis, mediante el empleo de celdas de colisión de alta energía disponibles en diferentes instrumentos de MS molecular de última generación. La fragmentación a muy alta energía producida en estas celdas permite obtener iones marcadores específicos para diferentes elementos, facilitando así la posterior localización e identificación de proteínas modificadas con metales. En el trabajo, se han estudiado las diferentes configuraciones instrumentales y técnicas de fragmentación, y se ha comparado la eficiencia en la extracción de la información elemental. Puesto que este trabajo consistió en el desarrollo de la metodología y la prueba del concepto, la metodología fue aplicada al análisis de muestras sencillas como péptidos modelo incubados con cisplatino y otros elementos de interés en metalómica como el iodo y los marcadores MeCAT. Finalmente, se aplicó a una muestra más compleja de un suero sanguíneo incubado con cisplatino. Por otra parte, se han realizado experimentos preliminares de MALDI-imagen que muestran distribuciones de metal similares a las obtenidas mediante LA-ICP-MS.

Una vez demostrada la posibilidad de obtener un ión marcador específico de Pt empleando las celdas de fragmentación a alta energía, la metodología desarrollada en el anterior trabajo fue aplicada a muestras más complejas como digeridos de albúmina incubada con cisplatino, con el fin de optimizar la obtención del ión marcador para su posterior aplicación a muestras biológicas de citosoles de riñón de ratas tratadas con este fármaco. Además, para ampliar su alcance, la metodología desarrollada fue

aplicada a otras muestras de interés en metalómica como las selenoproteínas. Aunque se han obtenido algunos resultados preliminares, en la actualidad se sigue trabajando en la obtención de nuevos resultados.

Trabajo 5

Bridging the gap between molecular and elemental mass spectrometry: Higher Energy Collisional Dissociation (HCD) revealing elemental information

Analytical Chemistry 87 (2015), 1613-1621

Este trabajo fue presentado como Comunicación Oral en el congreso “Colloquium Spectroscopicum Internationale XXXIX” celebrado en septiembre de 2015 en Figueira da Foz, Coimbra, Portugal

Bridging the Gap between Molecular and Elemental Mass Spectrometry: Higher Energy Collisional Dissociation (HCD) Revealing Elemental Information

Diego Esteban-Fernández,[†] Ahmed H. El-Khatib,^{†,‡,||} Irene Moraleja,^{§,||} M. Milagros Gómez-Gómez,^{*,§} and Michael W. Linscheid^{*,†}

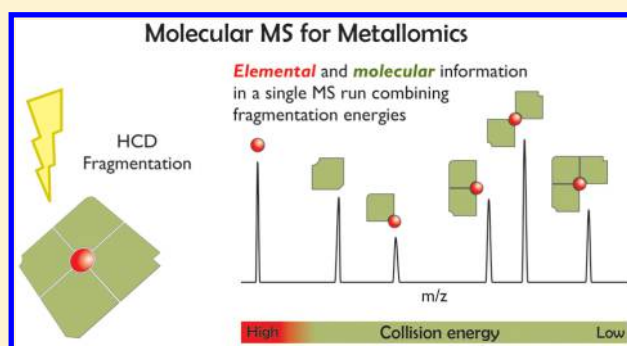
[†]Department of Chemistry, Humboldt-Universität zu Berlin, Brook-Taylor Str. 2, 12489, Berlin, Germany

[‡]BAM Federal Institute for Materials Research and Testing, Richard-Willstätter Str. 11, 12489, Berlin, Germany

[§]Department of Analytical Chemistry, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040, Madrid, Spain

S Supporting Information

ABSTRACT: Molecular mass spectrometry has been applied to simultaneously obtain molecular and elemental information from metal-containing species. Energy tuning of the higher-energy collision dissociation (HCD) fragmentation cell allows the controlled production of typical peptide fragments or elemental reporter ions informing about the metallic content of the analyzed species. Different instrumental configurations and fragmentation techniques have been tested, and the efficiency extracting the elemental information has been compared. HCD fragmentation operating at very high energy led to the best results. Platinum, lanthanides, and iodine reporter ions from peptides interacting with cisplatin, peptides labeled with lanthanides-MeCAT-IA, and iodinated peptides, respectively, were obtained. The possibility to produce abundant molecular and elemental ions in the same analysis simplifies the correlation between both signals and open pathways in metallomics studies enabling the specific tracking of metal-containing species. The proposed approach has been successfully applied to *in solution* standards and complex samples. Moreover, interesting preliminary MALDI-imaging experiments have been performed showing similar metal distribution compared to laser ablation (LA)-ICPMS.



In the last decades, scientists from different spheres of the scientific community have witnessed or even participated in the huge progress of mass spectrometry (MS) techniques. For instance, proteomics has profoundly changed, among others, thanks to the development of soft ionization sources. In this way, the high throughput analysis of peptides and the subsequent sequencing and protein assignment using databases was made possible.¹

MS techniques can be classified as molecular or elemental MS according to the type of ions produced and detected, which mainly depends on the ionization source used. Molecular techniques are equipped with ionization sources which preserve, to a certain extent, the original structure of the detected species. Thus, the structural identification of the analyte is attainable with the assistance of fragmentation techniques. The online coupling of separation dimensions, as in MudPIT-based strategies (multidimensional protein identification technology), is fundamental for high throughput analysis of complex mixtures such as those coming from biological systems.² Moreover, mass to charge detection helps to resolve coeluted species which is a major advantage compared to other detectors. However, the structure-dependent ionization effi-

ciency hampers the quantification capabilities and is an important limitation of these MS techniques.

On the other hand, elemental MS techniques, namely, ICPMS, are more appropriate for quantification. The main features of this technique are the outstanding sensitivity due to the high efficient plasma ionization, the wide linear dynamic range, the multielemental capacity, and the structure-independent response.

Thus, the complementary use of both types of MS-based techniques is clearly advantageous, and many instances have been reported showing this synergy. Parallel coupling after splitting the chromatographic flow³ or independent chromatographic runs with both detections⁴ are some of the experimental designs applied to obtain elemental and molecular information on the same sample, that is, to obtain qualitative-molecular and quantitative-elemental information, respectively. However, these approaches introduce additional analyses that expand greatly the experimental work, need synchronization of the elemental and molecular data, and require access to two MS

Received: August 13, 2014

Accepted: December 22, 2014

Published: December 22, 2014



techniques that usually do not coexist in the same laboratory, not to mention the access to installations with a parallel configuration. Moreover, the metal signal at certain retention time after LC-ICPMS detection cannot be immediately correlated with a certain mass from the ESI-MS spectra due to coelution of many masses.

With the advent of a new discipline called metallomics,⁵ new metal-containing species arise as analytes of interest for identification and quantification. The monitoring of such species by molecule-based MS is usually possible although their location in spectra from complex mixtures is not straightforward. A common way to find biomolecules modified by heteroatoms is the use of search engines where the metals can be introduced as chemical modifications. However, the metalated species are usually minority species and often difficult to ionize; therefore, weak signals and poor fragmentation spectra are acquired by data dependent MS methods. A complementary analysis by ICPMS can help to localize the metalated species in the chromatogram although the coelution of many species makes the unambiguous identification of the target analyte not possible. Another way to discover the metal-containing mass is to study the isotope patterns trying to find a metal-modified distribution of the isotopes. Small metals in big biomolecules and/or monoisotopic elements or elements with uncharacteristic profiles will produce nonsignificant modifications in the natural isotope pattern of the biomolecule and therefore will be difficult to assign. Then, to acquire reliable isotope patterns of the detected species, not only one but a group of spectra must be averaged, which is not always feasible using standard proteomics methods where many different events are scheduled allowing the detection and fragmentation of a higher number of ions.

In this work, we present a new method based on molecular MS and mass fragmentation to obtain molecular and elemental information in the same analysis. This approach allows controlled side-by-side elemental and molecular analysis of target species and improves noticeable alternative reported methods where a kind of in-source fragmentation is tuned to obtain an unspecific atomic response.⁶ Easy, fast, and unambiguous assignation of metal-containing species without relinquishing the structural analysis has been demonstrated. Different metal-containing biomolecules of interest in metallomics studies have been tested, including Pt-containing peptides after cisplatin treatments. For this purpose, higher-energy collision dissociation (HCD) has been employed as a fragmentation technique. Precursor ion fragmentation at unusual high energy allowed the detection of elemental ions and/or derivatives of the elements such as oxides and hydrides. Therefore, it is possible to obtain, sequentially, structural data from full scan and MS² spectra after low energy fragmentation by CID or HCD and elemental information after high energy HCD fragmentations.

■ EXPERIMENTAL SECTION

Chemicals and Materials. All purchased materials were used without further purification. The standard peptide RSYKLFMVKNKAGQ was kindly supplied by Instituto de Biología Molecular Eladio Viñuela (Madrid, Spain). The standard peptides SCHIAEVEK, WWCNDGR, and KPVEEYANCHLAR were purchased from Schafer-N (Copenhagen, Denmark). Cisplatin, human blood serum, bovine serum albumin (BSA), 2-amino-2-hydroxymethylpropane-1,3-diol buffer (Tris-NO₃), sodium chloride, dithiothreitol (DTT), *tris*(2-

carboxyethyl)phosphine (TCEP), triethylammonium bicarbonate (TEAB), ammonium bicarbonate, potassium iodide, and sodium dithionite were purchased from Sigma-Aldrich (Taufkirchen, Germany). Acetonitrile (ACN) and methanol (MeOH) (Ultra Gradient, HPLC grade) were purchased from J.T.Baker (Deventer, Netherlands). Water used for all experiments was purified with an USF Elga Purelab Plus system (ELGA, Marlowe, UK).

Incubation of Standard Peptide with Cisplatin. The standard peptide RSYKLFMVKNKAGQ was prepared at 250 μ M in 4.64 mM NaCl and 10 mM 2-amino-2-hydroxymethylpropane-1,3-diol buffer (Tris-NO₃) at pH 7.4, simulating intracellular physiological conditions. The peptide was incubated with 2-fold excess cisplatin during 66 h at 37 °C. Subsequently, 100 μ L of the incubated solution was retained in microsolid phase extraction tips (OMIX C18 100 μ L, Millipore, USA) and eluted in 50 μ L of MeOH/H₂O 60:40 v/v with 0.1% formic acid for desalting and removal of the excess of drug.

Human Blood Serum Incubation with Cisplatin.

Human blood serum samples were incubated with cisplatin at a protein/drug molar ratio of 1:10, in a buffer containing 4.64 mM NaCl and 10 mM Tris-NO₃ (pH 7.4) in order to reproduce intracellular physiological conditions. Incubations were performed at 37 °C for 96 h. To remove unreacted cisplatin, samples were filtered through an Amicon Ultra-0.5 mL Ultracel-3 (3.0 kDa cutoff filter, Millipore, USA) by centrifugation at 14 000g during 30 min. Finally, cisplatin-bound proteins contained in the retentate were recovered by reversing the filter and centrifugation at 1000g for 2 min. A further washing step of the retained protein fraction with the incubation buffer was also carried out.

Human Blood Serum–Cisplatin Digestions. Clean-up, tryptic digestion, and preconcentration of the incubated serum was performed using the FASP (filter aided sample preparation) method described elsewhere,⁷ loading a total protein content of 250 μ g. Samples were reduced with 5 mM DTT during 30 min at 37 °C and alkylated with iodoacetamide 20 mM during 30 min at room temperature in darkness before digestion. The tryptic digestion (porcine trypsin, gold mass spectrometry grade, Promega, USA) was carried out twice at 37 °C overnight with a trypsin to protein ratio of 1:50.

Bovine Serum Albumin Digestions. Bovine serum albumin was prepared in 50 mM ammonium bicarbonate at 2.5 mg mL⁻¹. Denaturation was achieved using 10% ACN and incubation for 30 min at 50 °C. Trypsin was added in the ratio of 1:100 trypsin/protein and incubated for 4 h at 37 °C. A second aliquot of trypsin was added, and the solution was incubated overnight at 37 °C.

Labeling of Standard Peptides and Digested BSA with Ln-MeCAT-IA.

The standard peptides SCHIAEVEK and WWCNDGR were prepared in 50 mM ammonium bicarbonate at 2 mM. Before labeling, they were diluted in ultrapure H₂O to 50 μ M and reduced with 3-fold excess TCEP per disulfide bridge for 30 min at 50 °C. The labeling was performed in 500 mM TEAB buffer at pH 8.2 and 3-fold excess per thiol group of Ho-MeCAT-IA or Lu-MeCAT-IA overnight at room temperature. Reduction and then labeling of the digested BSA with Lu-MeCAT-IA were conducted under the same conditions.

Iodination of Standard Peptides. The standard peptide KPVEEYANCHLAR was diluted in 20 mM Tris-HCl buffer (pH 8.5) to 60 μ M. Before iodination, the peptide was reduced with 3-fold excess TCEP per disulfide bridge for 30 min at 50 °C and alkylated with 1 mM iodoacetamide for 30 min at room

temperature in darkness to avoid oxidation of the cysteines and dimerization. Subsequently, the iodination was performed following the procedure described elsewhere.⁸ Briefly, the iodination was performed using 50 mM potassium iodide in Tris-buffered saline saturated with elemental iodine. A solution of 5 mM sodium dithionite was prepared just before use to stop the iodination reaction.

Liquid Chromatography Separation. A nano LC system (Agilent 1100 series, Germany) equipped with a Zorbax 300SB-C18 (150 mm \times 75 μ m, Agilent) analytical column and a Zorbax 300SB-C18 (5 \times 0.3 mm, Agilent) trap column was used for the separation of the different metal-containing biomolecules used in this work. The coupling to the electrospray ionization (ESI) sources was done either with a Nanomate ESI interface (Advion) working at 1.7 kV or with a conventional nanoESI source. Positive ionization mode and a transfer capillary temperature of 200 $^{\circ}$ C were applied. Chromatographic elution programs of 35 min at a flow rate of 0.30 μ L min⁻¹ were used. The employed gradient was 0/10, 5/10, 25/32, 26/90, and 29.5/90 expressed as time/%B, where mobile phase A was 5% ACN and 0.1% formic acid and mobile phase B was 99.9% ACN and 0.1% formic acid.

Mass Spectrometry Detection and Fragmentation. Mass spectrometers with electrospray ionization (ESI) or matrix-assisted laser desorption/ionization (MALDI) were used for the fragmentation studies. The instruments used were equipped with time-of-flight (TOF), quadrupole (Q), linear ion trap (LTQ), FTICR (Fourier transform ion cyclotron resonance), and Orbitrap mass analyzers. The employed instruments were ESI-Q-TOF (Micromass, Manchester, UK), MALDI-LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany), ESI-Q-Orbitrap (Q-Exactive, Thermo Fisher Scientific), ESI-LTQ-FTICR (Thermo Fisher Scientific), and ESI-LTQ-Orbitrap (Thermo Fisher Scientific). The fragmentation techniques employed were CID (collision-induced dissociation), HCD (higher energy collisional dissociation), ECD (electron-capture dissociation), IRMPD (infrared multiphoton dissociation), and PQD (pulsed-Q dissociation). The HCD technique was available in all instruments except the ESI-Q-TOF and ESI-LTQ-FTICR while CID fragmentation was possible in all the employed mass spectrometers.

In all the instruments, the detection was carried out after the analyzer with higher resolution. Resolving powers of 60 000 and 100 000 were used for full scan events in the Orbitrap and FTICR analyzer, respectively. Fragmentation spectra were acquired at a typical mass resolving power of 30 000. For exact mass calculations, the minimum mass resolving power was set to 100 000. Isolation windows of $\Delta m/z$ from 3 to 8 were employed depending on the charge state and isotope pattern of the target precursor ions.

The sample was introduced either by coupling a nanoLC system or by direct infusion of the sample loaded in a nanospray needle using a nanoESI source. The latter required previous desalting of the sample by microsolid phase extraction tips (OMIX C18 10 μ L, Millipore). For the MALDI experiments, 2.5 mg mL⁻¹ α -cyano-4-hydroxycinnamic acid (CHCA) matrix with 0.1% v/v trifluoroacetic acid (TFA) was mixed 1:1 with the desalted sample and a single droplet of 0.5 μ L was deposited on the plate.

MALDI-MS and LA-ICPMS Imaging. For the MALDI-imaging experiments, the MALDI-LTQ-Orbitrap instrument equipped with a mini-nitrogen laser (MNL 100, wavelength 337 nm, pulse halfwidth 3 ns, and repetition rate 60 Hz) was

used. The peptide WWCNDGR was labeled with Ho-MeCAT-IA and Lu-MeCAT-IA following the procedure described above. The solutions were desalted using OMIX C18 (10 μ L, Millipore, USA) and eluted in ACN/H₂O 50:50 v/v with 0.1% TFA. 2.5 mg mL⁻¹ CHCA matrix with 0.1% TFA was used as MALDI matrix and mixed 1:1 with the desalted samples.

Single droplets of 0.5 μ L were deposited on a glass slide. In the first place, the sample containing Ho-MeCAT-IA labeled peptide was deposited and dried. Then, the peptide labeled with Lu-MeCAT-IA was deposited overlapping with the first droplet.

The same deposition was consecutively imaged with two different techniques. First, MALDI-MS used spiral raster scanning mode (spiral step size of 100 μ m), raster step size of 250 μ m, and laser energy of 30 μ J. Three events were used for each spiral raster cycle, full scan, and fragmentation of the intact labeled peptide with HCD at two NCE, 35% and 400% (isolation window of 16 Da centered at m/z 1653.5).

Laser ablation (LA, LSX-213, Nd:YAG 213 nm, CETAC, USA) inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS, X-Series II, Thermo Fisher Scientific) was used to acquire the elemental image of ¹⁶⁵Ho and ¹⁷⁵Lu. The ablation was done over the same droplets previously analyzed by MALDI-MS. The laser was tuned for optimal sample ablation and operated at 100% laser energy (1.5 mJ) and 20 Hz repetition rate. Linear scanning mode at 50 μ m s⁻¹ scan speed and a 100 μ m laser spot size was applied. Helium was used as the carrier gas at a flow rate of 0.9 L min⁻¹.

■ RESULTS AND DISCUSSION

Instrumental Strategies for the Production of the Elemental Reporter Ion by HCD Fragmentation. The first aim of this work was the selective detection and identification of platinated species after treatment/incubation with Pt-containing drugs. However, the potential of the results pushed the authors to apply the developed strategy to other samples of interest in metallomics such as DOTA-labeled and iodinated biomolecules, extending the scope of this proof of concept. The interaction of Pt-containing drugs with biomolecules is an interesting topic for the comprehension of antitumoral mechanisms and for the design of new, more effective, and side-effect free drugs.⁹ Pt species are especially difficult to follow by molecule-based MS mainly due to the poor ionization efficiency achieved by ESI and MALDI sources. Moreover, the abundance of platinated biomolecules in biological samples treated with clinical concentrations of Pt-containing drugs is very low. The specific and sensitive monitoring by ICPMS of the Pt signal after chromatographic separation of the biomolecules has been frequently used¹⁰ but suffers from the identification problems mentioned above. For this reason, a new way to easily and unambiguously locate and identify platinated biomolecules using ESI-MS analysis was tried, avoiding complementary ICPMS monitoring or confirmation by the always tedious and difficult to automate isotope pattern search. The great variety of fragmentation techniques available in MS allowed us to tackle the quest for characteristic fragments from Pt species to track platinated biomolecules. A wide range of fragmentation techniques and ionization sources was tested for this study.

The first experiments were conducted using the standard peptide RSYKLFMVNKAGQ after incubation with cisplatin under simulated physiological conditions. According to our previous experience with these type of samples, the CID

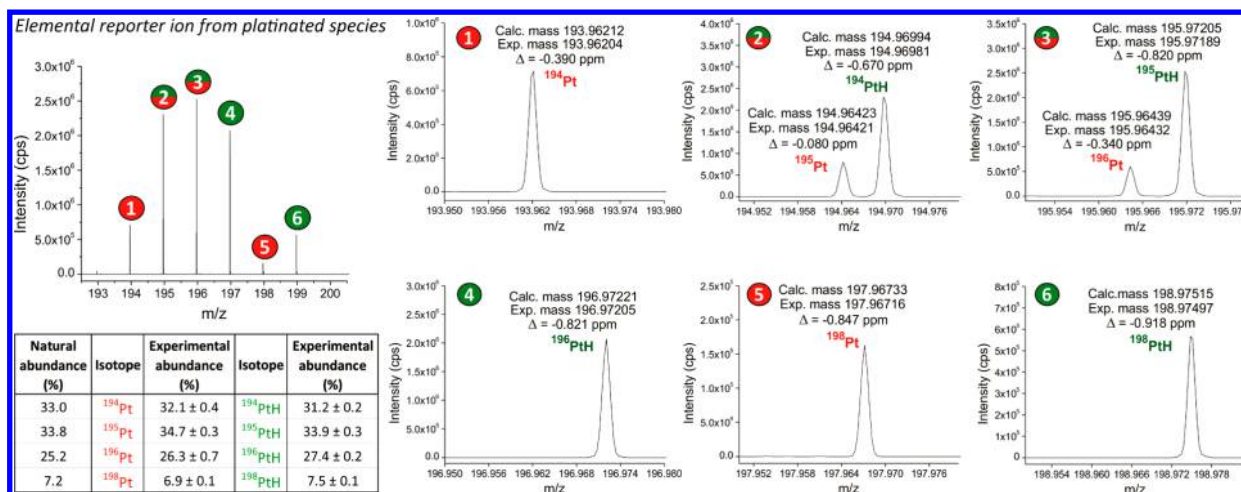


Figure 1. Characterization of the reporter ions $[Pt]^+$ and $[PtH]^+$ obtained after high energy HCD fragmentation using high resolution ESI-Q-Orbitrap detection. Comparison of the calculated and experimental exact masses and isotope patterns is shown.

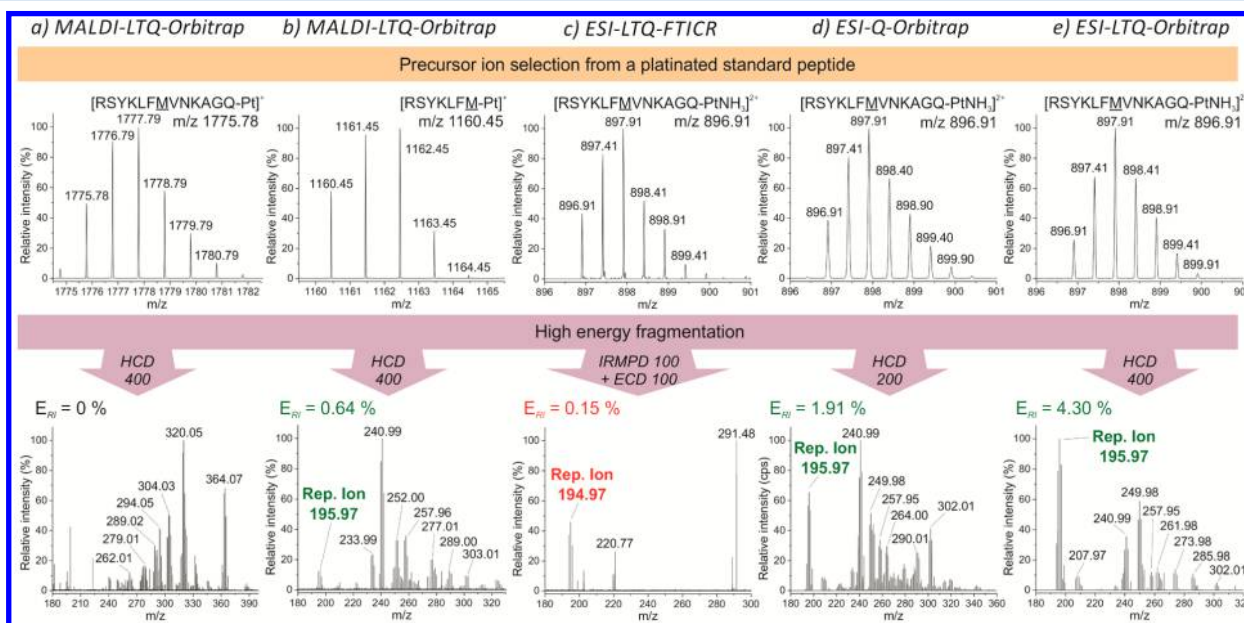


Figure 2. Fragmentation study of the platinated peptide RSYKLFMVNKAGQ using different MS instruments and fragmentation techniques, (a and b) MALDI-LTQ-Orbitrap with HCD fragmentation, (c) ESI-LTQ-FTICR combining IRMPD and ECD fragmentation, (d) ESI-Q-Orbitrap with HCD fragmentation, and (e) ESI-LTQ-Orbitrap with HCD fragmentation. Precursor ions used were those detected with a lower charge state except for (b) where an in-source fragment after MALDI ionization was isolated and fragmented. Platinated amino acid is underlined in the sequence of the peptide.

fragmentation technique does not provide interesting results beyond the usual fragmentation pattern for peptide sequencing. Therefore, other fragmentation techniques were tried. The collision cell in an ESI-Q-TOF instrument was tested by increasing the collision energy until a voltage of 110 V was reached.

Higher collision energy induced complete loss of signal. At voltages of 90–110 V, some ions with Pt-modified isotope pattern could be detected in the low mass range (below m/z 400), growing in intensity with increasing voltage (Figure S1 in the Supporting Information). These fragment ions can be considered specific reporter ions from platinated peptides.

Using the same type of ionization, the ESI-Q-Orbitrap (Q-Exactive) equipped with a HCD cell was tried, since higher energies can be applied to the precursor ions compared to the Q-TOF instrument. At HCD normalized collision energies

(NCE) between 20% and 50%, typical peptide fragments were observed in accordance with reported behaviors¹¹ (data not shown). The platinated fragments generated with the Q-TOF instrument could be detected in the Q-Exactive at NCE values of around 80% which means 96 V for a precursor ion of m/z 600. In contrast to the Q-TOF, higher energies led to good MS² spectra probably due to the stabilization of the produced fragments in the C-Trap before the submission of the ions to the Orbitrap analyzer.

When the energy was increased up to the maximum (NCE 200%), smaller base peak fragments with Pt isotope pattern were generated. When the resolving power was set at 140 000, two species were identified by exact mass with mass error of <1 ppm, namely, $[Pt]^+$ and $[PtH]^+$ (Figure 1). Also, the isotope abundances of both species were measured yielding a good correlation between the theoretical natural abundances and the

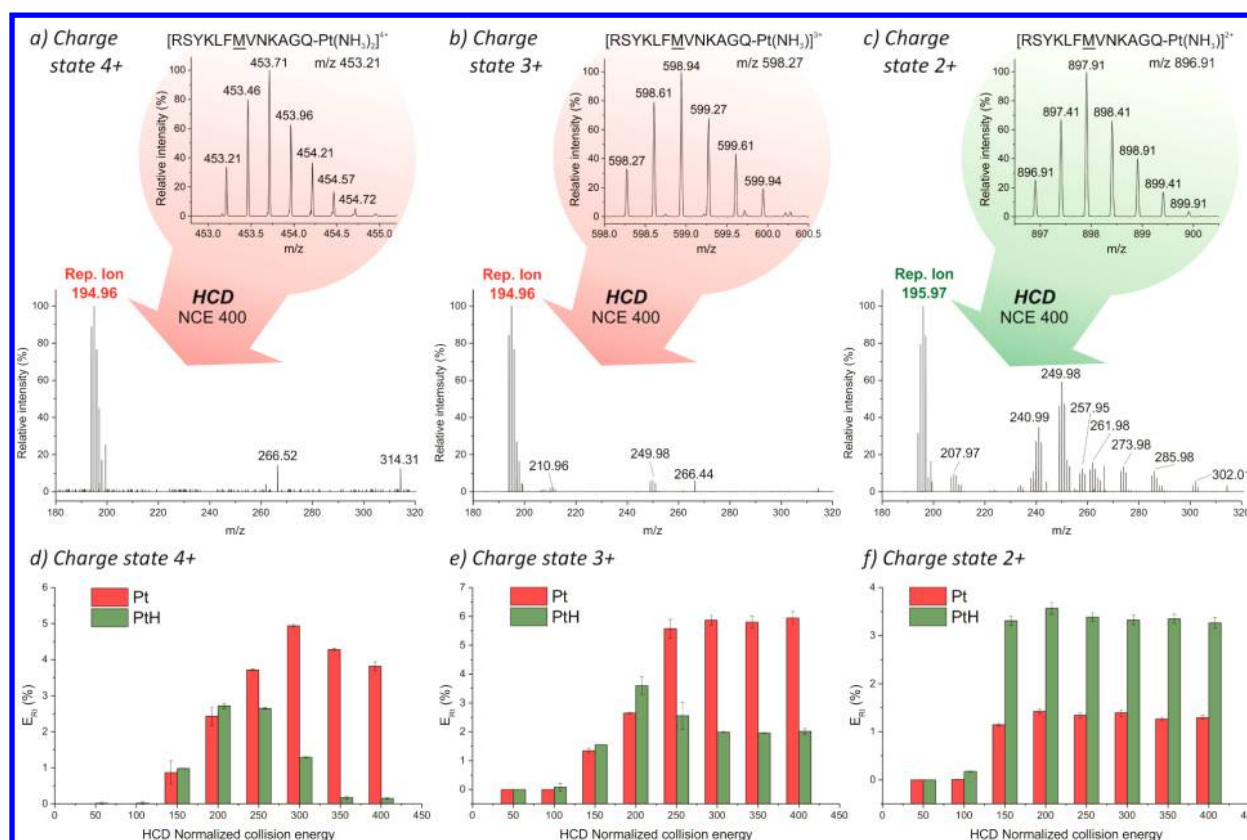


Figure 3. ESI-LTQ-Orbitrap HCD fragmentation at NCE 400% of the platinumated standard peptide RSYKLFMVNKAGQ isolating precursor ion charge states (a) 4+, (b) 3+, and (c) 2+. Study of the efficiency in the production of the elemental reporter ions [Pt]⁺ and [PtH]⁺ at different HCD fragmentation energies isolating precursor ion charge states (d) 4+, (e) 3+, and (f) 2+. Platinumated amino acid is underlined in the sequence of the peptide.

experimental abundances detected for [Pt]⁺ (red) and [PtH]⁺ (green) (Figure 1). These two species are produced simultaneously at high collision energies in the HCD cell and are specific fragments of Pt peptides. Therefore, they can be used to unequivocally assess the presence of Pt in a detected peptide, hereinafter in this Article referred to as Pt reporter ion. The efficiency in the generation of such a Pt reporter ion is good enough to track Pt species with high sensitivity as discussed below.

The generation of this specific Pt elemental reporter ion was systematically studied with ESI and MALDI ionization sources and different activation techniques. In Figure 2, the results from the fragmentation of the same platinumated standard peptide with different instruments and fragmentation techniques are shown. When the same mass was detected in more than one charge state in full scan, the lower charge state precursor ion was isolated for subsequent fragmentation. The efficiency in the production of the reporter ion was estimated by the parameter E_{RI} , which is the intensity percent of the highest isotope of the Pt reporter ion compared with the highest isotope in the precursor ion pattern.

The use of the HCD fragmentation led to similar results after MALDI or ESI ionization. However, since only singly charged precursor ions are generated in MALDI, the fragmentation into [Pt]⁺ or [PtH]⁺ is less efficient. Figure 2a,b,e shows results from the LTQ-Orbitrap instrument working at maximum NCE in the HCD cell (400%). ESI (Figure 2e) produces multiply charged ions and yields more Pt reporter ions than MALDI

instrument fragmenting singly charged precursor ions (Figure 2a,b).

When platinumated peptides bigger than 1500 Da were fragmented after MALDI ionization (Figure 2a), no [Pt]⁺ or [PtH]⁺ reporter ions were observed, but other Pt-containing fragments at higher mass were detected. However, isolation and fragmentation of in-source fragments from the same peptide with a mass around 1200 Da led to MS² spectra where the Pt reporter ion could be detected ($E_{RI} = 0.64\%$) (Figure 2b). As expected, the low energy employed in PQD and CID fragmentation techniques did not produce Pt reporter ion or even fragments with Pt-modified isotope patterns with either MALDI or ESI ionization (data not shown).

To complete the fragmentation study, ECD and IRMPD techniques were tested in an ESI-LTQ-FTICR. The combination of these fragmentation techniques provided one of the mentioned reporter ions, [Pt]⁺; however, the overall intensity ($E_{RI} = 0.15\%$) was very low compared to the results obtained after HCD fragmentation (Figure 2c). Neither ECD nor IRMPD produced the Pt-specific fragments when they were applied independently.

Finally, the instrument that offered the best ionization/fragmentation combination to produce the Pt reporter ion was the ESI-LTQ-Orbitrap ($E_{RI} = 4.30\%$, Figure 2e) due to the ESI multiply charged ions and the possibility to use HCD fragmentation at NCE up to 400% in contrast to the 200% allowed in the Q-Exacte ($E_{RI} = 1.91\%$, Figure 2d). Compared to the other tested instruments, the fragments with a Pt profile in the lower mass range other than [Pt]⁺ and [PtH]⁺ were

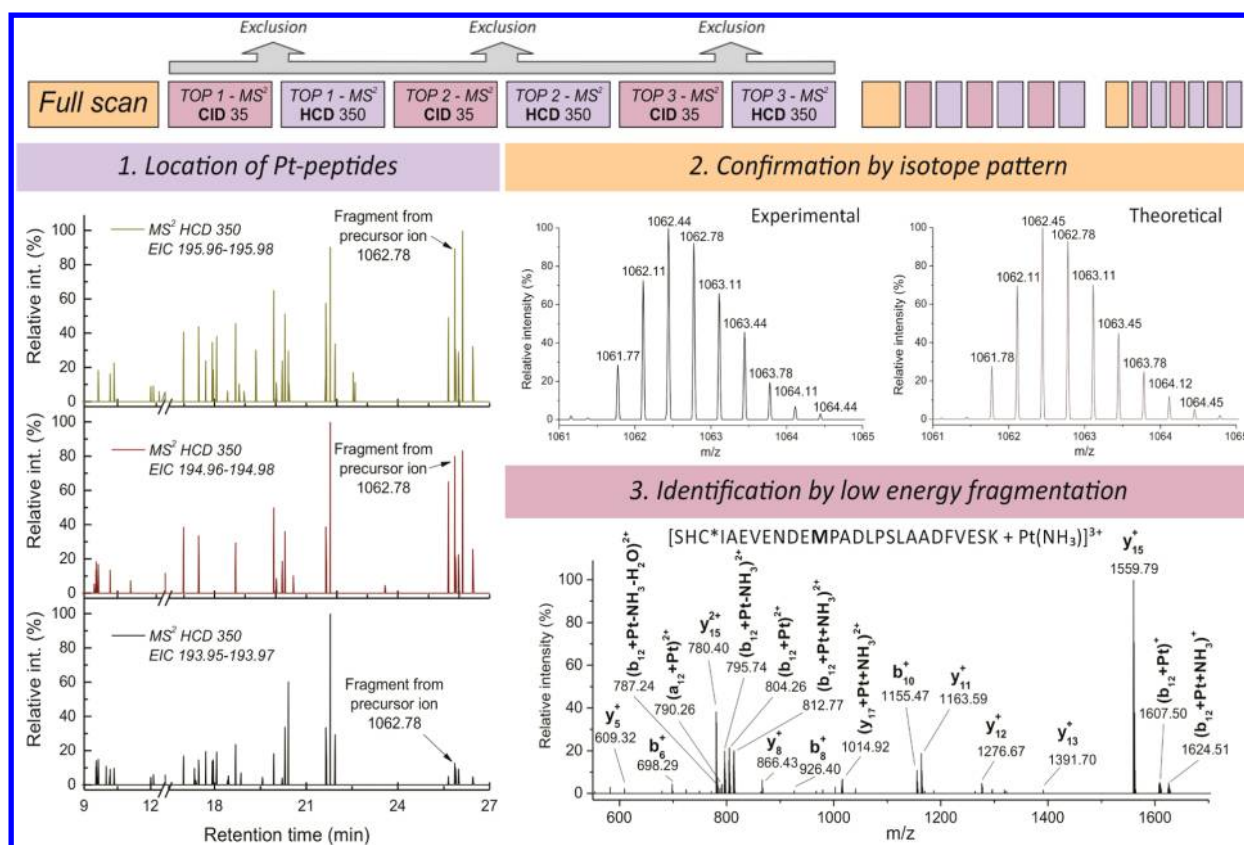


Figure 4. Scheme of the mass spectrometry method employed for the sequential location and identification of Pt peptides in human blood serum. (1) Detection and location in the chromatogram of the Pt peptides by checking the presence of Pt reporter ion after HCD fragmentation of single precursor ions at NCE of 350%. Extracted ion chromatogram (EIC) of the three main masses of the Pt reporter ion. (2) Confirmation of the Pt content by isotope pattern matching of the precursor ion. (3) Identification of one Pt peptide (precursor ion at m/z 1062.78) using CID fragmentation at NCE of 35%. Platinated amino acid is underlined in the sequence of the peptide.

much less abundant in the ESI-LTQ-Orbitrap. The efficiency in the generation of the reporter ion is a major issue when minority platinated peptides are monitored.

Fragmentation of Platinated Standard and Blood Serum Peptides. Using the ESI-LTQ-Orbitrap instrument, different experiments were performed to characterize the production of the Pt reporter ion. The influence of the precursor ion charge state and the optimal collision energy were studied using the same standard peptide. In Figure 3a–c, the fragmentation of the platinated peptide after isolating precursor ions with charge states 4+, 3+, and 2+, respectively, is shown.

As expected, higher charge states favor the production of the reporter ion. For charge states 4+ and 3+, mainly the reporter ion is detected in the MS² spectrum while the charge state 2+ precursor ions lead to many other fragments with Pt-modified isotope patterns indicating incomplete fragmentation. In addition, higher charge states enhance formation of the fragment [Pt]⁺ over [PtH]⁺. Figure 3d–f shows the evolution of the two fragments with the collision energy applied to the HCD cell. For charge states 4+ and 3+, the [Pt]⁺ fragment is the most abundant from NCE of 250%, with 300% being the optimal energy. Unlike the charge state 4+, which achieves efficiency values of around 5% at NCE of 300%, the charge state 3+ maintains a fragmentation efficiency close to 6% over the range from 300% to 400%. The precursor ion 2+ is fragmented mainly to [PtH]⁺, and poorer maximum efficiencies

of around 3.5% are achieved in the NCE range from 200% to 400%.

The introduction of high energy HCD events in conventional MS methods for proteomics demonstrated an outstanding performance acquiring sequentially structural and elemental information in real samples.

Human blood serum incubated with cisplatin was analyzed with a typical LC-ESI-MS/MS proteomics method including an extra event for HCD fragmentation at NCE 350% (Figure 4). After data analysis, it was possible to locate Pt-containing peptides following the Pt reporter ion signal in the high energy fragmentation spectra as well as identify some platinated peptides thanks to the fragmentation spectra from the CID event at NCE of 35%. Up to 23 platinated species were detected, and many of them were confirmed by isotope pattern matching of the precursor ion. Furthermore, it was possible to identify in the blood serum incubated with cisplatin one of the Pt peptides sequenced in a recently published work⁷ dealing with standard HSA incubated with cisplatin. Due to the low abundance of platinated peptides in biological samples, the MS² spectra are usually not suitable for identification as many authors have described before.¹² The Pt reporter ion highlights the peptides of interest and allows further targeted MS analysis trying to extract better structural information. It is interesting that, even when the intensity of the precursor ion is not high enough to obtain clear isotope patterns after full scan averaging, the Pt reporter ion is able to point out the presence of Pt (Figure S2 in the Supporting Information). Therefore, this

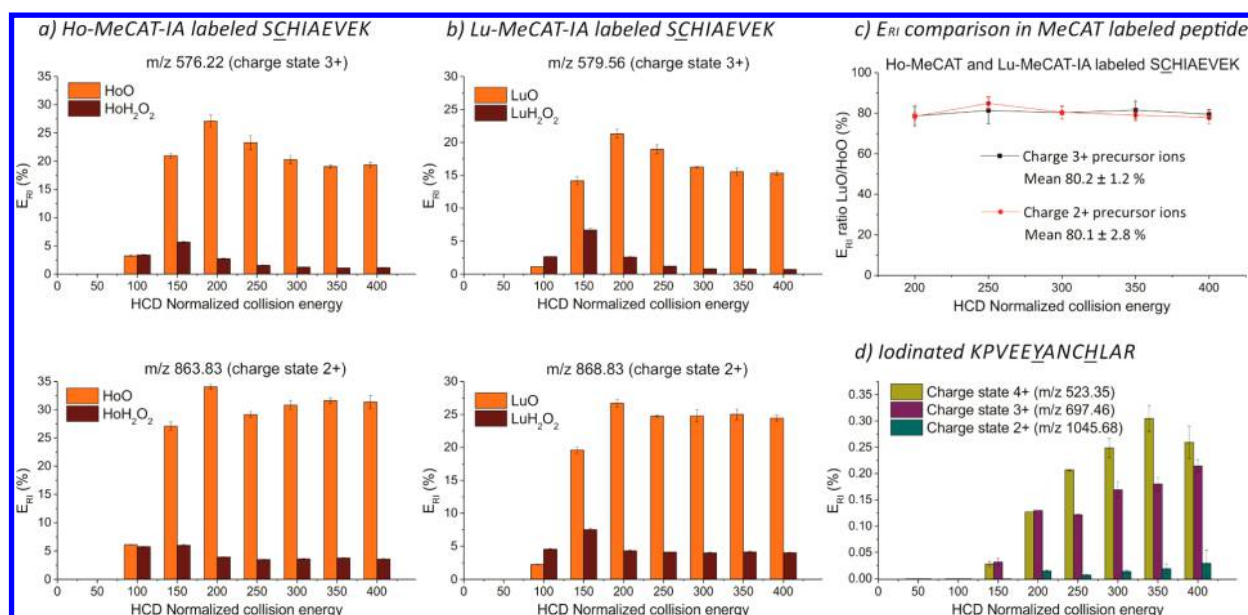


Figure 5. Study of the efficiency in the production of elemental reporter ions from (a) Ho-MeCAT-IA and (b) Lu-MeCAT-IA labeled standard peptide SCHIAEVEK at different HCD fragmentation energies using an ESI-LTQ-Orbitrap. (c) Efficiency ratios of both lanthanides at different energies. Comparison of precursor ion charge states of 2+ and 3+. (d) Study of the efficiency in the production of elemental reporter ions from iodinated standard peptide KPVEEYANCHLAR at different HCD fragmentation energies. Modified amino acids are underlined in the sequence of the peptide.

approach provides reliable results and is able to locate with little effort many more Pt peptides than the time-consuming isotope pattern matching procedure.

Fragmentation of MeCAT Labeled Species. Next, we analyzed biomolecules labeled with lanthanide DOTA complexes using the same approach. Stable isotope labeling has been successfully applied for protein quantification, and nowadays, techniques such as iTRAQ or SILAC are widely employed for this task. Recently, labels containing metallic ions have been introduced to make use of the outstanding features of ICPMS for quantification. DTPA- or DOTA-based tags have been reported for the labeling of cysteine and amino residues.¹³ Moreover, interesting variations, such as dual labeling of the mentioned residues¹⁴ or specific monitoring of oxidized peptides/proteins targeting the sulfenic acid after cysteine oxidation,¹⁵ have been published recently. Thus, the high energy HCD fragmentation was investigated in the standard peptide SCHIAEVEK labeled with Ho-MeCAT-IA and Lu-MeCAT-IA reagents, namely, DOTA-based compounds loaded with Ho or Lu including an iodoacetamide cysteine-reactive group. As has been shown in several publications, this type of DOTA-based labels leads to characteristic fragment ions using low energy HCD or IRMPD fragmentation¹⁶ (NCE of 35% and 60%, respectively), that is used for relative quantification of the labeled species. The application of high energy HCD (NCE 400%) produced the expected elemental reporter ions as base peaks in the corresponding fragmentation spectra (Figure S3a,b in the Supporting Information). The most abundant reporter ions were the oxide forms $[\text{HoO}]^+$ and $[\text{LuO}]^+$, although other derivatives ($[\text{HoH}_2\text{O}_2]^+$ and $[\text{LuH}_2\text{O}_2]^+$) were also detected. The identification of these lanthanide species was done by exact mass (Figure S3a,b in the Supporting Information). In some fragmentations of multiply charged small ions, it was possible even to detect the lanthanide ions $[\text{Ho}]^+$ and $[\text{Lu}]^+$. The efficiency in the generation of the elemental reporter ion is higher than in the platinated species and, according to these

first experiments, also higher than the DOTA characteristic fragments for the studied peptides (data not shown).

The complete labeling achieved with DOTA-based labels allowed us to better calculate LODs than with platinated species whose metalation level and, therefore, concentration were unknown. For the studied labeled standard peptide, it was possible to detect the reporter ion after injection of 200 amol.

These very low detection limits are possible due to the outstanding efficiency in the generation of the described elemental reporter ions (up to 34%) (Figure 5). Figure 5a,b, shows the evolution of the elemental reporter ion species with the HCD fragmentation energy for the same peptide labeled with Ho-MeCAT-IA and Lu-MeCAT-IA, respectively. The optimal value was 200% regardless of the precursor ion charge state. Higher energies led to similar results. Although the tendency is similar to that shown in Figure 3, the optimum value is substantially different from Pt species. In addition, the efficiency in the production of the reporter ion was always higher for Ho than for Lu labeled species, and it is interesting that the ratio between both lanthanides remain constant from NCE 200% to 400% (Figure 5c). Therefore, the use of the HoO/LuO ratio for relative quantification in multiplexing experiments is possible once the response factor is known.

The elemental reporter ion performance in a complex biological matrix was also investigated. For this purpose, Lu-MeCAT-IA labeled BSA tryptic digest was added to a digested human blood serum sample in an estimated ratio of 1:4 BSA/serum. After LC(C18)-ESI-LTQ-Orbitrap analysis, the location of the labeled peptides in the chromatogram was found using the elemental reporter ion. The employed MS method consisted of a full scan analysis followed by five MS² data dependent events using HCD fragmentation at NCE 200%. All the 25 BSA cysteinyl labeled peptides produced Lu reporter ions, even those coeluting with high amounts of unlabeled blood serum peptides. The complexity of the sample can be observed in Figure S4a in the Supporting Information, where

the total ion current (TIC) chromatogram is much more intense than the extracted ion chromatogram (EIC) for the labeled peptides. Figure S4b in the Supporting Information shows the EIC chromatogram of the Lu reporter ion ($[\text{LuO}]^+$) and the corresponding precursor ions (also listed on Table S1 in the Supporting Information). It is worth mentioning that the profile of the EICs in Figure S4a,b in the Supporting Information match each other, demonstrating once more the specificity of the elemental reporter ion signal. Thus, the efficiency and utility of the elemental reporter ion approach for metal-containing species tracking in biological matrices has been proved.

An interesting potential application of the high energy HCD fragmentation is the elemental tracking for imaging purposes. Peptide WWCNDGR was labeled with Ho-MeCAT-IA and Lu-MeCAT-IA, and one droplet of each was deposited on a glass slide for consecutive MALDI-MS and LA-ICPMS imaging analysis. Similar images with both techniques were acquired proving the suitability of high energy HCD fragmentation to extract elemental information (Figure S5 in the Supporting Information). Moreover, the MS method designed for the MALDI-MS experiment allowed us to obtain similar images by extracting the labeled peptides (precursor ions), the elemental reporter ions after HCD at NCE 400% and peptide fragments after HCD at NCE 35% (Figure S5d,e,f in the Supporting Information, respectively). Subsequent identification was also possible within the same experiment using the low energy fragmentation spectra (HCD 35%).

Fragmentation of Iodinated Species. To expand the scope of the approach, iodinated biomolecules were subjected to high energy HCD fragmentation. Iodine has been used for covalent labeling of proteins and antibodies among others. The absolute quantification of peptides by capillary LC-ICPMS¹⁷ or the imaging of single cells and the tissue section by LA-ICPMS¹⁸ have been performed after iodination of the sample taking advantage of the excellent detection limits for iodine using ICPMS. Many different iodination agents have been tried for fast and complete iodination of the biomolecules. Specifically in proteins, the labeling can occur at the ortho-positions of the tyrosine and at histidine residues; therefore, two iodine atoms can be introduced in each of these amino acids. In this work, a standard peptide containing one tyrosine and one histidine residue (KPVEEYANCHLAR) has been labeled with iodine using potassium triiodide under controlled conditions of pH.⁸ The completely labeled standard peptide was subjected to the high energy HCD fragmentation method. Once more, the heteroatom-tagged biomolecule provided the elemental reporter ion under intense fragmentation conditions, in this case being the iodine ion itself detected by ESI-MS/MS. As in the previous examples, the elemental reporter ion, m/z 126.90388 (theoretical exact mass for iodine 126.90392 amu), is the base peak of the fragmentation spectra (Figure S3c in the Supporting Information) although the efficiency in the production of the fragment (maximum $E_{\text{RI}} = 0.30\%$ at NCE 350% isolating charge state 4+ precursor ions) is not as high as for Pt or lanthanides containing biomolecules (Figure Sd). Higher charge states led to significant better fragmentation of the peptide into the elemental reporter ion.

Although more studies are necessary, the efficiency in the production of the elemental reporter ion correlates inversely with the ionization potential of the monitored elements and with the strength of the binding. Thus, iodine, which is the least efficiently produced reporter ion, is covalently bound to the

histidines and tyrosines and has the highest ionization potential of the elements studied in this work.

CONCLUSION

For first time, HCD fragmentation has been applied to obtain element-specific information from metal- or heteroatom-containing species using molecule-based MS. This method is able to easily and unequivocally track Pt in concrete biomolecules from samples impacted by Pt-based drugs. In addition, this approach has been successfully applied to DOTA-lanthanide and iodine labeled species. These results broaden the scope of this strategy and promise applications for other metalloproteins even in complex biological matrices, as it has been demonstrated. Thus, the presented approach is a methodological advance of high interest and immediate impact for many researchers working in fields such as bioinorganic analysis or metallomics since an easy modification in the mass spectrometry method can provide important additional information.

This strategy cannot replace the structure-independent and sensitive analysis performed by ICPMS. However, it is a promising new method to obtain molecular and elemental information using only one type of MS instrumentation and opens a wide range of interesting combinations to track target species. The applicability to biological samples has been shown with a simple MS method combining low and high fragmentation energy. Alternative protocols are being developed for the implementation of this new strategy for the high throughput detection and identification of metal-modified species in biological samples.

The quantification of metal-containing species using the elemental reporter ion after HCD fragmentation suffers from the same structure-dependent ionization drawbacks that penalize the quantification by ESI or MALDI-based MS techniques. However, some preliminary results show the potential capacity of this strategy to perform sensitive and accurate multiplexed relative quantification of species labeled with metal-containing tags such as MeCAT-IA labels (DOTA-based compounds). Moreover, comparable elemental images from metal containing spots were acquired using MALDI-MS and LA-ICPMS.

ASSOCIATED CONTENT

Supporting Information

Additional information as noted in text. This material is available free of charge via the Internet at <http://pubs.acs.org>.

AUTHOR INFORMATION

Corresponding Authors

*E-mail: m.linscheid@chemie.hu-berlin.de. Tel: +493020937575. Fax: +493020936985.

*E-mail: mmgomez@ucm.es.

Author Contributions

^{||}A.H.E.-K. and I.M. contributed equally to this work.

Notes

The authors declare no competing financial interest.

ACKNOWLEDGMENTS

We gratefully acknowledge Proteome Factory AG and Thermo Fisher Scientific for the generous instrumental and technical support and DAAD for the scholarship to A.H.E.-K. This work was supported by the Spanish MINECO (CTQ2011-24585

and PRI-AIBDE-2011-0937, Ministry of Economy and Competitiveness) and Programme des Projektbezogenen Personenaustauschs (DAAD, Germany). I.M.-S.J. also acknowledges Universidad Complutense de Madrid for the predoctoral fellowship. The authors also want to thank Ulf Bergmann, Boris Neumann, Prof. Dr. Christian Scheler, Dr. Larissa Müller, and Frank Bierkandt for the useful discussions.

■ REFERENCES

- (1) Nesvizhskii, A. I.; Vitek, O.; Aebersold, R. *Nat. Methods* **2007**, *4*, 787–797.
- (2) Washburn, M. P.; Wolters, D.; Yates, J. R., 3rd *Nat. Biotechnol.* **2001**, *19*, 242–247.
- (3) Profrock, D. *J. Anal. At. Spectrom.* **2010**, *25*, 334–344.
- (4) Esteban-Fernandez, D.; Scheler, C.; Linscheid, M. W. *Anal. Bioanal. Chem.* **2011**, *401*, 657–666.
- (5) Haraguchi, H. *J. Anal. At. Spectrom.* **2004**, *19*, 5–14.
- (6) Pedersen, S. N.; Francesconi, K. A. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2000**, *14*, 641–645.
- (7) Moraleja, I.; Moreno-Gordaliza, E.; Mena, M. L.; Gomez-Gomez, M. M. *Talanta* **2014**, *120*, 433–442.
- (8) Waentig, L.; Jakubowski, N.; Hayen, H.; Roos, P. H. *J. Anal. At. Spectrom.* **2011**, *26*, 1610–1618.
- (9) Esteban-Fernandez, D.; Moreno-Gordaliza, E.; Canas, B.; Palacios, M. A.; Gomez-Gomez, M. M. *Metallomics* **2010**, *2*, 19–38.
- (10) Esteban-Fernandez, D.; Montes-Bayon, M.; Blanco Gonzalez, E.; Gomez Gomez, M. M.; Palacios, M. A.; Sanz-Medel, A. *J. Anal. At. Spectrom.* **2008**, *23*, 378–384.
- (11) Michalski, A.; Neuhauser, N.; Cox, J.; Mann, M. *J. Proteome Res.* **2012**, *11*, 5479–5491.
- (12) Moreno-Gordaliza, E.; Esteban-Fernandez, D.; Giesen, C.; Lehmann, K.; Lazaro, A.; Tejedor, A.; Scheler, C.; Canas, B.; Jakubowski, N.; Linscheid, M. W.; Gomez-Gomez, M. M. *J. Anal. At. Spectrom.* **2012**, *27*, 1474–1483.
- (13) (a) Prange, A.; Profrock, D. *J. Anal. At. Spectrom.* **2008**, *23*, 432–459. (b) Ahrends, R.; Pieper, S.; Kuhn, A.; Weisshoff, H.; Hamster, M.; Lindemann, T.; Scheler, C.; Lehmann, K.; Taubner, K.; Linscheid, M. W. *Mol. Cell. Proteomics* **2007**, *6*, 1907–1916.
- (14) El-Khatib, A. H.; Esteban-Fernandez, D.; Linscheid, M. W. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, *403*, 2255–2267.
- (15) El-Khatib, A. H.; Esteban-Fernandez, D.; Linscheid, M. W. *Anal. Chem.* **2014**, *86*, 1943–1948.
- (16) (a) Pieper, S.; Beck, S.; Ahrends, R.; Scheler, C.; Linscheid, M. W. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2009**, *23*, 2045–2052. (b) Benda, D.; Schwarz, G.; Beck, S.; Linscheid, M. W. *J. Mass Spectrom.* **2014**, *49*, 13–18.
- (17) Pereira Navaza, A.; Ruiz Encinar, J.; Ballesteros, A.; Gonzalez, J. M.; Sanz-Medel, A. *Anal. Chem.* **2009**, *81*, 5390–5399.
- (18) Giesen, C.; Waentig, L.; Mairinger, T.; Drescher, D.; Kneipp, J.; Roos, P. H.; Panne, U.; Jakubowski, N. *J. Anal. At. Spectrom.* **2011**, *26*, 2160–2165.

Supporting Information

Bridging the Gap between Molecular and Elemental Mass Spectrometry: Higher Energy Collisional Dissociation (HCD) Revealing Elemental Information

Diego Esteban-Fernández¹, Ahmed H. El-Khatib^{1,2*}, Irene Moraleja-San José^{3*}, M. Milagros Gómez-Gómez³ & Michael W. Linscheid¹

¹ Department of Chemistry, Humboldt-Universität zu Berlin, Brook-Taylor Str. 2, 12489, Berlin, Germany.

² BAM Federal Institute for Materials Research and Testing, Richard-Willstätter Str. 11, 12489, Berlin, Germany.

³ Department of Analytical chemistry, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain.

* These authors contributed equally to this work.

Correspondence should be addressed to M.W.L. (m.linscheid@chemie.hu-berlin.de) or M.M.G.- G. (mmgomez@ucm.es).

The supporting material presented consists of Figures S1, S2, S3, S4 and S5, and Table S1. Moreover, some additional comments have been added to Figures S2 and S5.

In Figure S2, the isotope pattern matching for confirmation of the Pt-containing peptides located by the elemental reporter ion after high energy HCD fragmentation is shown. Some of the presented profiles match clearly with the expected profile for a given platinated peptide of similar weight. Some other profiles in Figure S2 also correlate with the expected pattern although some of the less intense isotopes are very small or not present (m/z 2875.28). In this sense, the elemental reporter ion is a valuable tool to locate Pt-peptides which cannot be detected with enough sensitivity in the full scan to draw accurately the isotope pattern. Therefore, this fragmentation strategy not only simplifies the search of the target species but also improves the results compared with the time consuming and tedious manual search of modified isotope patterns.

The alternatively use of the high energy HCD fragmentation for imaging purposes is demonstrated in Figure S5. After deposition of two droplets containing Ho-MeCAT-IA and Lu-MeCAT-IA labeled standard peptide WW \underline{C} NDGR, respectively, consecutive MALDI-MS and LA-ICP-MS analyses were performed. From the images presented it can be conclude that the elemental distribution obtained by ICP-MS can be reproduced using the elemental signal of the reporter ion of the molecular MS technique (Figure S5b, c and e). Although the spatial resolution employed in the MALDI experiment is much lower than the LA image, the first one has the advantage of being able to acquire in the same experiment structural information of concrete species for identification purposes (Figure S5d and f).

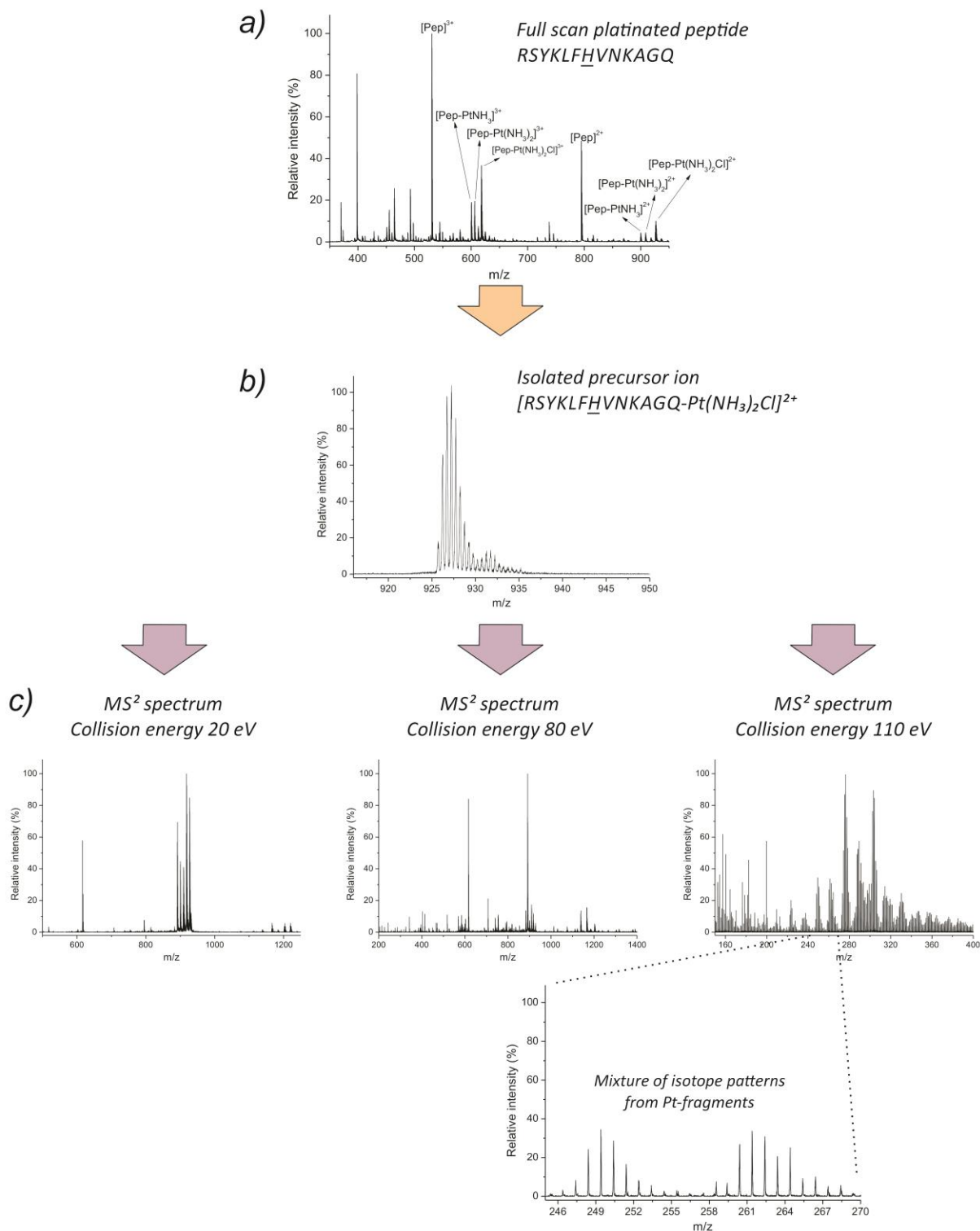
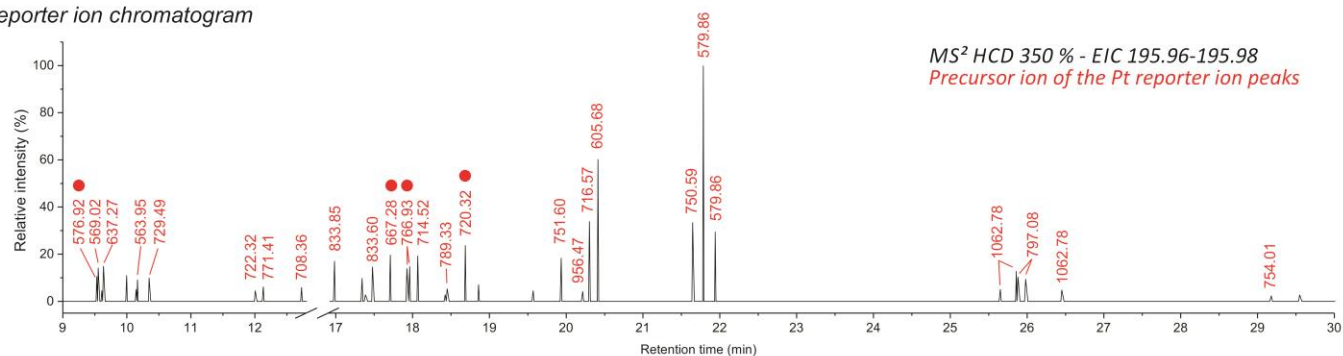
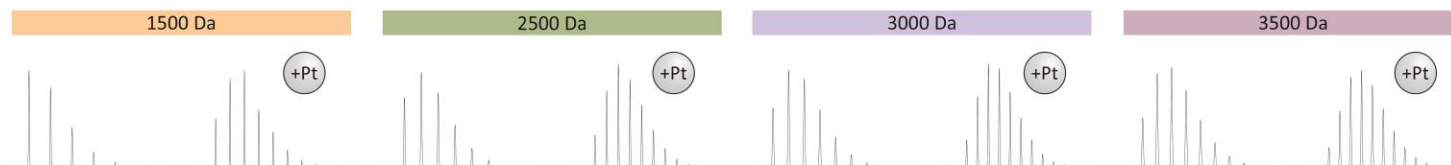


Figure S1. Direct infusion analysis of the platinated peptide RSYKLFHVNKAGQ using an ESI-Q-TOF instrument. a) Full scan, b) isolation of the precursor ion $[\text{RSYKL}\underline{\text{F}}\text{HVNKAGQ-Pt}(\text{NH}_3)_2\text{Cl}]^{2+}$ and c) fragmentation at different collision energies (20, 80 and 110 eV) of the precursor ion.

a) *Pt* reporter ion chromatogram



b) *Theoretical isotope patterns modified by Pt*



c) *Experimental isotope patterns. Serum peptides presenting Pt reporter ion after high energy HCD fragmentation*

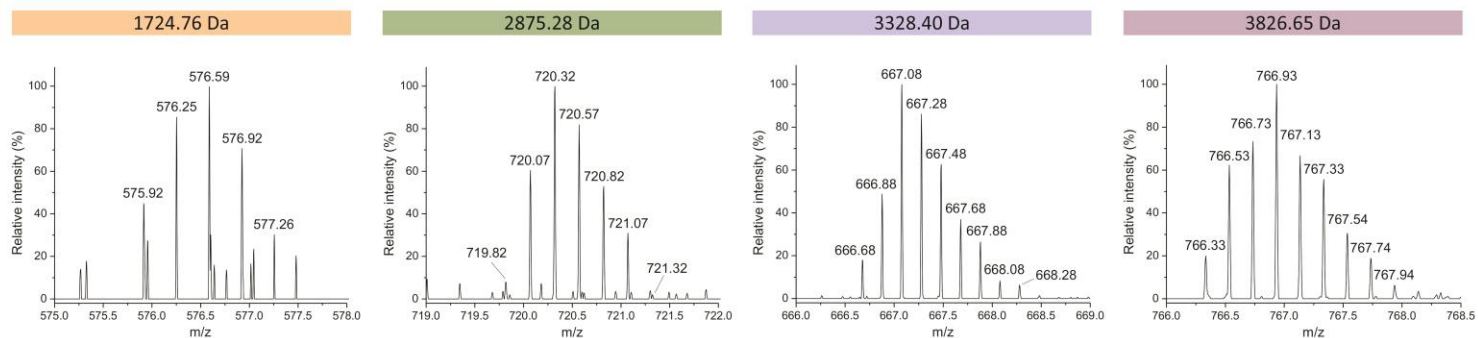


Figure S2. Use of the *Pt* reporter ion after high energy HCD fragmentation (NCE 350 %) in LC(C18)-ESI-LTQ-Orbitrap analysis for the location of *Pt*-peptides in a human blood serum sample incubated with cisplatin. a) MS² extracted ion chromatogram of the *Pt* reporter ion isotope at m/z 195.97 (precursor ion from which the reporter ion peak is produced is indicated in red; precursor ions detailed in panel c are indicated with a red dot). b) Comparison of theoretical isotope patterns of *Pt*-free and *Pt*-containing peptides at different molecular weights. c) Detail of the acquired isotope pattern of some precursor ions reported as platinated in panel a.

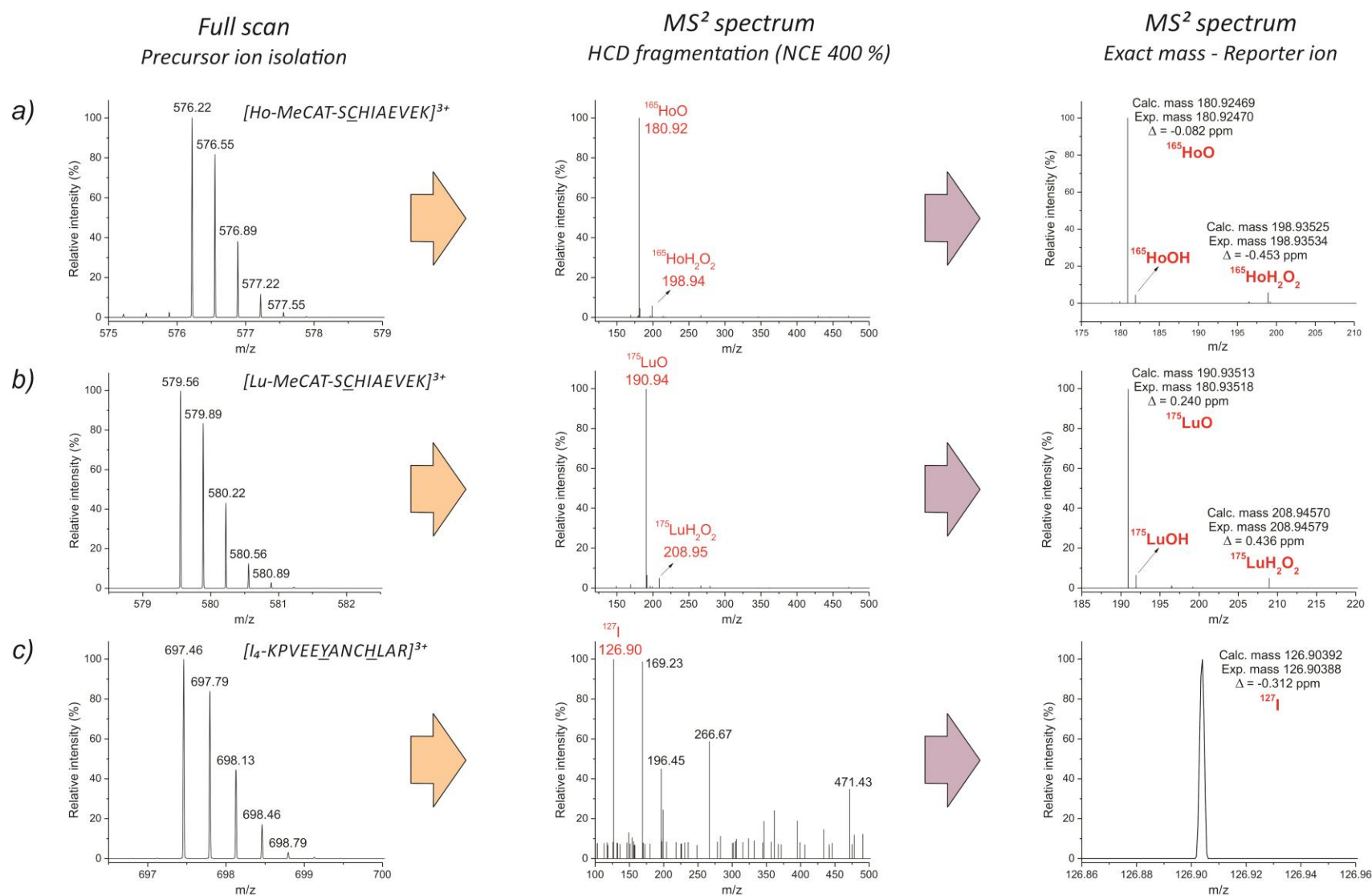
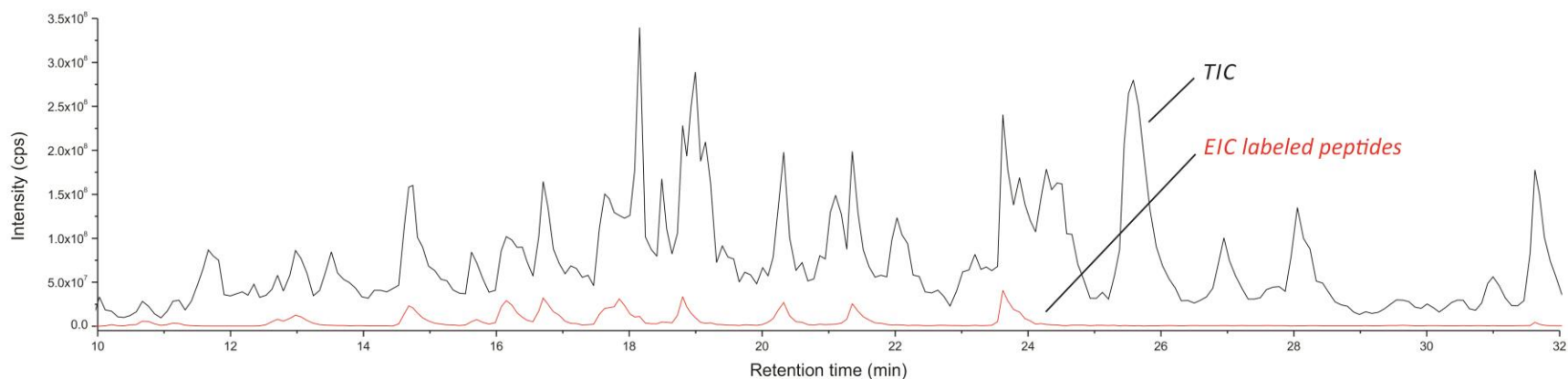


Figure S3. High energy HCD fragmentation (NCE 400%) spectra of peptides containing Ln-MeCAT-IA labels or iodine. a) Ho-MeCAT-SCHIAEVEK, b) Ho-MeCAT-SCHIAEVEK, and c) I₄-KPVEEYANCHLAR. Full scan of the selected precursor ions and MS² spectrum are shown. Detailed view of the MS² spectrum for identification by exact mass of the elemental reporter ions.

a) TIC chromatogram and EIC of the BSA labeled peptides



b) Lu reporter ion chromatogram

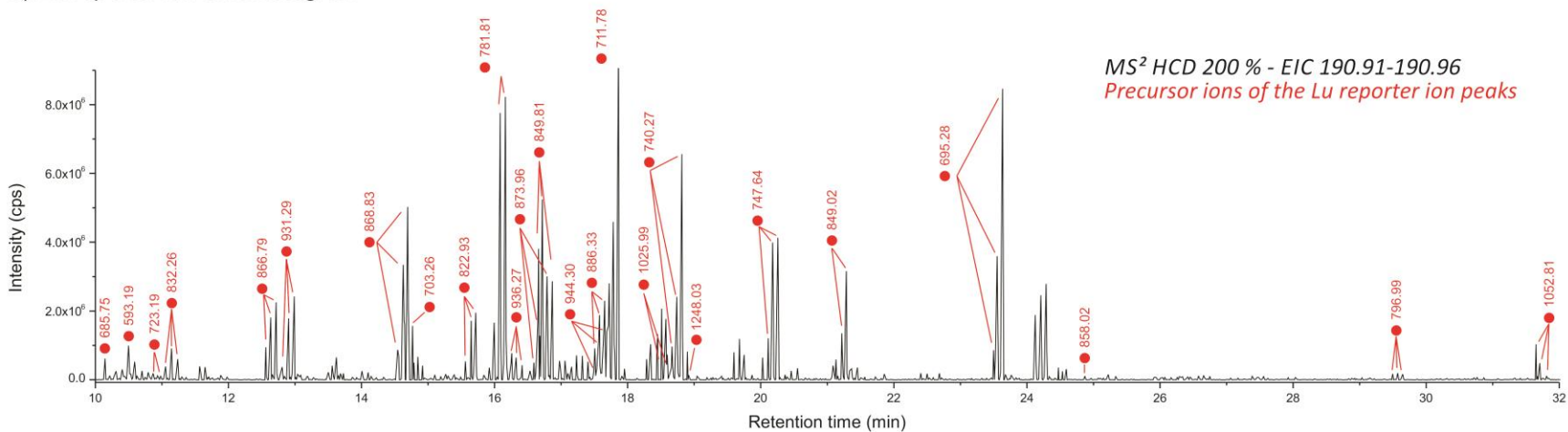


Figure S4. Use of the Lu reporter ion after high energy HCD fragmentation (NCE 200 %) in LC(C18)-ESI-LTQ-Orbitrap analysis for the location of Lu-MeCAT-IA labeled peptides spiked in a human blood serum sample. a) Comparison of the total ion current (TIC) chromatogram (black) and the extracted ion chromatogram (EIC, red) of all the labeled peptides. b) MS² EIC of the Lu reporter ion isotope at m/z 190.935 (precursor ion from which the reporter ion peak is produced is indicated in red; precursor ions highlighted in Table S1 are shown with a red dot).

Table S1. List of BSA tryptic peptides, theoretical masses for unlabeled and Lu-MeCAT-IA labeled peptides, expected m/z values for 2+ and 3+ adducts, and experimental elution time in the described chromatographic system.

BSA cysteinyl tryptic peptides	Mass (Da)	Pep-Lu-MeCAT-IA (Da)	m/z [Pep-Lu-MeCAT-IA]²⁺	m/z [Pep-Lu-MeCAT-IA]³⁺	Elution time (min)
DVCK	463.2095	1184.3703	593.1925	395.7974	10.49
CASIQK	648.3259	1369.4867	685.7507	457.5029	10.67
GACLLPK	700.3936	1421.5544	711.7845	474.8588	17.86
LCVLHEK	840.4522	1561.6130	781.8138	521.5450	16.15
NECFLSHK	976.4431	1697.6039	849.8093	566.8753	16.70
QNCDQFEK	1010.4122	1731.5730	866.7938	578.1983	12.71
SHCIAEVEK	1014.4799	1735.6407	868.8277	579.5542	14.74
EACFAVEGPK	1049.4846	1770.6454	886.3300	591.2224	17.63
SLHTLFGDELCK	1361.6644	2082.8252	1042.4199	695.2824	23.62
YICDNQDTISSK	1385.6127	2106.7735	1054.3941	703.2651	14.68
CCAADDK	724.2515	2166.5732	1084.2939	723.1984	10.86
DDPHACYSTVFDK	1496.6236	2217.7844	1109.8995	740.2688	18.80
LKPDPNTLCDEFK	1518.7383	2239.8991	1120.9569	747.6403	20.32
MPCTEDYLSLILNR	1666.8053	2387.9661	1194.9904	796.9960	29.64
CCTESLVNR	1023.4472	2465.7689	1233.8917	822.9303	15.70
CCTKPESER	1051.4421	2493.7638	1247.8892	832.2619	11.13
RPCFSALTPDETYVPK	1822.8918	2544.0526	1273.0336	849.0248	21.35
LFTFHADICTLPDTEK	1849.8915	2571.0523	1286.5335	858.0247	24.84
ECCDKPLLEK	1176.5513	2618.8730	1310.4438	873.9650	16.70
TCVADESHAGCEK	1348.5382	2790.8599	1396.4372	931.2939	12.98
ETYGDMADCCEK	1363.4725	2805.7942	1403.9044	936.2720	16.31
EYEATLEECCA	1387.5630	2829.8847	1415.9496	944.3022	17.63
YNGVFQECCQAEDK	1632.6543	3074.9760	1538.4953	1025.9993	18.56
GLVLIAFSQYLQQCPFDEHVK	2434.2350	3155.3958	1578.7052	1052.8059	31.63
ECCHGDLLECADDR	1577.5903	3741.0728	1871.5437	1248.0316	18.87

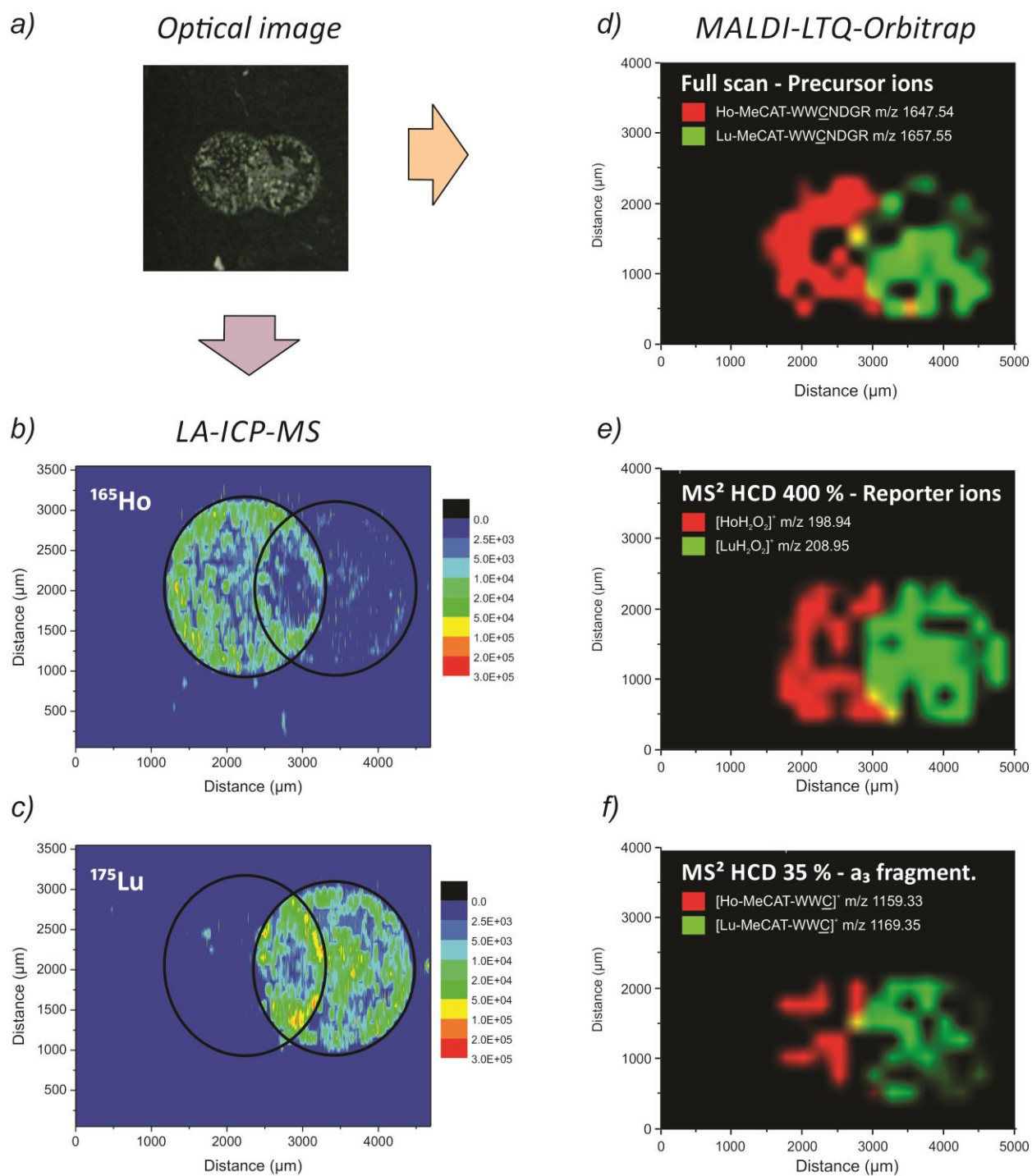


Figure S5. Imaging of two overlapped droplets containing Ho-MeCAT-WWCNDGR and Lu-MeCAT-WWCNDGR. a) Optical image. b) LA-ICP-MS analysis monitoring ^{165}Ho and c) ^{175}Lu . d) MALDI-LTQ-Orbitrap analysis showing the extracted ion image for the intact labeled peptides (precursor ions), e) the elemental reporter ions after HCD fragmentation at NCE 400% and f) the a_3 ion fragment from the peptide after HCD low energy fragmentation (NCE 35 %).

Capítulo 2. DESARROLLO DE METODOLOGÍAS PARA LA OBTENCIÓN MEDIANTE LA-ICP-MS DE BIOIMÁGENES CUALITATIVAS Y CUANTITATIVAS DE TEJIDOS IMPACTADOS CON FÁRMACOS DE Pt

PARTE EXPERIMENTAL

2. Desarrollo de metodologías para la obtención mediante LA-ICP-MS de bioimágenes cualitativas y cuantitativas de tejidos impactados con fármacos de Pt

El análisis de la distribución elemental en muestras biológicas mediante LA-ICP-MS ha sido empleado en las últimas décadas por la medicina moderna para el estudio de diversas enfermedades. En relación al estudio de los mecanismos involucrados en la nefrotoxicidad inducida por cisplatino, el estudio de la distribución de este fármaco en el tejido renal presenta un gran interés. En estudios realizados previamente en nuestro grupo de investigación, ha sido demostrada la utilidad de la técnica LA-ICP-MS para la determinación de la distribución del Pt en riñones de ratas tratadas con cisplatino, observándose una mayor acumulación del fármaco en la zona cortical, donde se ven afectadas fundamentalmente las células renales epiteliales del túbulo proximal. Sin embargo, la diferente nefrotoxicidad que presentan el carboplatino y oxaliplatino hace interesante ampliar el estudio a la distribución de dichos fármacos en el riñón, con el fin de relacionar las diferentes distribuciones y acumulaciones renales con su comportamiento nefrotóxico. De hecho, Esteban-Fernández *et al.* demostraron tras el análisis de digeridos renales que la acumulación de oxaliplatino en riñón es mayor que la de cisplatino para una misma dosis administrada, sin embargo, el oxaliplatino no induce nefrotoxicidad, lo que hace pensar que no sólo el grado de acumulación sino también su distribución y a qué tipo de biomoléculas se une el fármaco pudieran ser factores responsables de la aparición de la nefrotoxicidad.

Por ello, el objetivo de esta sección se centró en el estudio de la distribución y acumulación de cisplatino, carboplatino y oxaliplatino en riñones de ratas tratadas con dichos fármacos. Con este fin, y debido a que en la técnica de ablación láser la señal obtenida se ve sometida a diversas fluctuaciones en función del tiempo, debido a diferentes parámetros instrumentales y de la muestra, es necesario recurrir a procedimientos de normalización de la señal con el fin de obtener bioimágenes que puedan ser comparables. Por otro lado, con el fin de obtener imágenes cuantitativas que permitan evaluar la acumulación de dichos fármacos, es necesario el desarrollo de métodos de cuantificación para bioimagen. Por tanto, los trabajos presentados en esta sección se basan en el desarrollo de metodologías que permitan la obtención de bioimágenes cuali- y cuantitativas para los tres fármacos.

El trabajo 6 (**“Printing metal-spiked inks for LA-ICP-MS bioimaging internal standardization: comparison of the different nephrotoxic behaviour of cisplatin carboplatin and oxaliplatin”** *Analytical and Bioanalytical Chemistry* (2016) 408, 2309-2318), se centró en el desarrollo de una nueva estrategia para la estandarización interna de la señal obtenida tras el análisis por LA-ICP-MS de láminas de riñones impactadas con los fármacos mencionados anteriormente. Dicha metodología se basa en la preparación de una tinta comercial enriquecida con un patrón interno, y la posterior impresión de los tejidos con una impresora convencional. Las diferentes distribuciones y acumulaciones observadas para los tres fármacos fueron relacionadas con el diferente comportamiento nefrotóxico descrito previamente para estos fármacos, habiéndose encontrado sólo comportamientos nefrotóxicos para el cisplatino y el carboplatino (administrado a altas dosis), y una distribución de oxaliplatino en el riñón totalmente diferente a los otros dos fármacos, lo que podría explicar su comportamiento no nefrotóxico. Las medidas instrumentales de este trabajo se realizaron durante una estancia realizada en el contexto de esta tesis doctoral en el centro de investigación “BAM Federal Institute for Materials Research and Testing” de Berlín, en el grupo del Prof. Dr. Norbert Jakubowski, y en colaboración con la empresa Proteome Factory AG de Berlín. Por otro lado, en el grupo del Dr. Tejedor del Hospital General Universitario Gregorio Marañón se efectuaron los

tratamientos de las ratas y se determinaron los diferentes parámetros bioquímicos renales.

El trabajo 7 (**“Isotope dilution analysis for the absolute quantification of metal contents in tissues by LA-ICP-IDMS”** *Analytical Chemistry* (2017) Enviado), se centró en la aplicación de la técnica de cuantificación absoluta de dilución isotópica para la obtención de bioimágenes bidimensionales cuantitativas. Dicho análisis se realizó por impresión (del mismo modo que en el trabajo anterior) de una tinta comercial enriquecida con el trazador sobre las láminas de tejido de riñón. Cabe destacar que es la primera vez que se aplica la dilución isotópica en los análisis de ablación por láser para la obtención de bioimágenes cuantitativas bidimensionales, lo cual permitió no sólo analizar la distribución de los fármacos antitumorales de Pt en el riñón sino también la acumulación cuantitativa de los mismos en las diferentes zonas del órgano. Las medidas instrumentales de este trabajo se realizaron durante una segunda estancia en el mismo centro y con las colaboraciones comentadas en el trabajo anterior.

Trabajo 6

**Printing metal-spiked inks for LA-ICP-MS bioimaging internal standardization:
comparison of the different nephrotoxic behavior of cisplatin, carboplatino, and
oxaliplatin**

Analytical and Bioanalytical Chemistry 408 (2016), 2309-2318

Este trabajo fue presentado como Comunicación Oral en el congreso “XX Reunión de la
Sociedad Española de Química Analítica” celebrado en julio de 2015 en Santiago de
Compostela, España
y en el “Colloquium Spectroscopicum Internationale XXXIX” celebrado en septiembre
de 2015 en Figueira da Foz, Coimbra, Portugal

Printing metal-spiked inks for LA-ICP-MS bioimaging internal standardization: comparison of the different nephrotoxic behavior of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin

Irene Moraleja¹ · Diego Esteban-Fernández² · Alberto Lázaro³ · Blanca Humanes³ · Boris Neumann^{4,5} · Alberto Tejedor³ · M. Luz Mena¹ · Norbert Jakubowski² · M. Milagros Gómez-Gómez¹

Received: 28 October 2015 / Revised: 15 December 2015 / Accepted: 12 January 2016
© Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2016

Abstract The study of the distribution of the cytostatic drugs cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin along the kidney may help to understand their different nephrotoxic behavior. Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) allows the acquisition of trace element images in biological tissues. However, results obtained are affected by several variations concerning the sample matrix and instrumental drifts. In this work, an internal standardization method based on printing an Ir-spiked ink onto the surface of the sample has been developed to evaluate the different distributions and accumulation levels of the aforementioned drugs along the kidney of a rat model. A conventional ink-jet printer was used to print fresh sagittal kidney tissue slices of 4 µm. A reproducible and homogenous deposition of the ink along the

tissue was observed. The ink was partially absorbed on top of the tissue. Thus, this approach provides a pseudo-internal standardization, due to the fact that the ablation sample and internal standard take place subsequently and not simultaneously. A satisfactory normalization of LA-ICP-MS bioimages and therefore a reliable comparison of the kidney treated with different Pt-based drugs were achieved even for tissues analyzed on different days. Due to the complete ablation of the sample, the transport of the ablated internal standard and tissue to the inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) is practically taking place at the same time. Pt accumulation in the kidney was observed in accordance to the dosages administered for each drug. Although the accumulation rate of cisplatin and oxaliplatin is high in both cases, their Pt distributions differ. The strong nephrotoxicity observed for cisplatin and the absence of such side effect in the case of oxaliplatin could explain these distribution differences. The homogeneous distribution of oxaliplatin in the cortical and medullar areas could be related with its higher affinity for cellular transporters such as MATE2-k.

Irene Moraleja and Diego Esteban-Fernández contributed equally to this work.

Electronic supplementary material The online version of this article (doi:10.1007/s00216-016-9327-0) contains supplementary material, which is available to authorized users.

✉ Diego Esteban-Fernández
diego.esteban-fernandez@bam.de

Keywords LA-ICP-MS · Bioimaging · Printed internal standard · Pt-based drugs · Nephrotoxicity

¹ Analytical Chemistry Department, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

² BAM Federal Institute for Materials Research and Testing, Richard-Willstaetter-Str.11, 12489 Berlin, Germany

³ Renal Physiopathology Laboratory, Department of Nephrology, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, Calle del Dr. Esquerdo, 46, 28007 Madrid, Spain

⁴ Proteome Factory AG, Magnusstraße 11, 12489 Berlin, Germany

⁵ Charité, Center for Cardiovascular Research, Hessische Str. 3-4, 10115 Berlin, Germany

Introduction

The main limitation for *cis*-diamminedichloroplatinum II (cisplatin) clinical application in cancer chemotherapy is nephrotoxicity, a major side effect probably due to its accumulation in the proximal tubule S3 segments of kidney cortex [1, 2]. New generation platinum-based drugs such as *trans*-L-1,2-diaminocyclohexaneoxalatoplatinum II (oxaliplatin) and *cis*-diammine-1,1-cyclobutanedicarboxylateplatinum II

(carboplatin) were developed by coordinating ligands of different nature to the platinum center, showing less nephrotoxic effects but also lower antitumoral efficacy. None nephrotoxic effects related to the administration of oxaliplatin are found in the literature [3], and only few results of nephrotoxicity caused by the administration of high dosages of carboplatin are reported [4]. Mass spectrometry-based studies have shown that these platinum-based drugs present different accumulation rates in kidney, being higher for oxaliplatin than cisplatin and lower for carboplatin [5]. However, the fact that oxaliplatin and carboplatin do not induce nephrotoxicity to the same extent as that of cisplatin would suggest that not only the total platinum content in the kidney but also the interaction of the platinum-based drugs with specific biomolecules are responsible for alterations in the kidney functionality. Indeed, platinum speciation studies performed by size exclusion chromatography (SEC)- inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) of cytosolic fractions of kidney tissues have shown the absence of free drug, indicating that the three platinum-based drugs were mostly bound to biomolecules [6]. Therefore, a closer look at the platinum distribution in kidney after *in vivo* experiments with cisplatin, oxaliplatin, and carboplatin would be helpful to find a correlation between renal damage and renal morphology and may shed some light on the molecular mechanisms involved in the nephrotoxicity that still remain unclear.

At present, mass spectrometry imaging (MSI) of elemental distributions in tissue sections using laser ablation (LA)-ICP-MS has been applied in modern medicine for the understanding and interpretation of diseases [7, 8]. Its main advantages over other surface analytical techniques, such as proton-induced X-ray emission spectrometry (PIXE), secondary ion mass spectrometry (SIMS), and synchrotron micro-X-ray fluorescence (S μ XRF), have high sensitivity (limits of detection at the $\mu\text{g g}^{-1}$ range), wide dynamic range (up to 9 orders of magnitude), multi-elemental capability, high sample throughput, a significantly lower rate of polyatomic ion formation (compared with SIMS), spatial resolution capacity in the micrometer range, and small material uptake ($<0.1 \mu\text{g s}^{-1}$) [9–11]. Indeed, in the field of platinum-based drugs, platinum map distributions in tissues being targeted by cisplatin have been determined by LA-ICP-MS [2, 12–16]. Furthermore, LA-ICP-MS have been used to study the distribution and bioavailability of platinum in rat tumor sections after hyperthermic intraperitoneal administration of oxaliplatin chemotherapy [17]. However, the comparison of the spatially resolved distribution of platinum in kidney tissues for the abovementioned platinum-based drugs has not been evaluated yet.

In LA-ICP-MS analysis, results are subjected to numerous variations concerning samples and measurement conditions. It is well known that the ablation process is influenced by the sample matrix and instrumental drifts, resulting in an overall loss of instrumental sensitivity over measurement time [18, 19]. Since the measurement of one kidney slice (around

200 mm²) by LA-ICP-MS requires approximately 5 h, different samples had to be measured in different days. Therefore, in order to compare bioimages obtained at different measuring sessions and/or for diverse tissue sections, the use of an internal standard is desirable. Conventional approaches in MSI by LA-ICP-MS for internal standardization use matrix elements as reference (such as the ¹³C signal) and thin polymeric films spiked with appropriate internal standards. However, the ¹³C signal is less sensitive to instrumental fluctuations than the analytes studied, has a significantly different atomic mass and/or first ionization potential to many analytes, and is not always homogeneously distributed within the different structures of tissues due to differences in tissue water content [20]. Improved accuracy and highest robustness were obtained using thin polymeric films because the polymer matrix was ablated in a similar manner than the tissue. Indeed, Austin et al. [21] reported an improved accuracy of quantification by LA-ICP-MS by using doped ruthenium or yttrium thin films containing soft tissue, but the complete ablation of the sample, including the polymeric film, has to be performed to ensure reproducible analysis. Moreover, the sample preparation process is tedious and time consuming. Recently, a new internal standard normalization methodology has been proposed, which includes the coating of the sample surface with metallic films such as gold [22] or commercial inks used in ink-jet printers with ordinary copper content or with metal spiked as a reference for electrophoresis gels [23] and nitrocellulose membranes [24], respectively. These alternatives are based on the simple deposition of a thin and homogeneous layer of the internal standard on the surface of the sample to be analyzed with little experimental effort and minimal sample handling that reduces the risk of contamination.

In this work, an internal standardization method based on printing an Ir-spiked ink is applied for first time on tissue samples. The kidney slices have been analyzed by LA-ICP-MS to study the distribution of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin along the kidney. The application of such methodology may help finding out insights of the different nephrotoxic behavior of these cytostatic compounds.

Experimental

Reagents and drugs

Cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin were purchased from Sigma-Aldrich Chemie (St. Louis, MO, USA). High-purity HNO₃ and HCl as well as the stock solutions of platinum and iridium (1000 mg L⁻¹) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). Ir-spiked ink was supplied by Proteome Factory AG (Berlin, Germany). All solutions were prepared employing ultrapure water (Milli-Q Ultra pure water systems, Millipore, USA).

Animal model and sample preparation

Animal studies were conducted in the Medicine and Experimental Surgery Unit of the Hospital General Universitario Gregorio Marañón (Madrid, Spain). Eight-week-old female Wistar rats (WKY) (Criffa, Barcelona, Spain) were used for this study. Rats were housed in controlled conditions of 12-h light/dark cycles, temperature, and humidity, with free access to food and water. Animals were weighed at the beginning and the end of the experiments, and they were handled at all times according to the applicable legal regulations in RD 53/2013 of 1 February on the protection of animals used for experimentation and other scientific purposes. Dosages administered were 5 mg kg⁻¹ body weight (bw) for both cisplatin and oxaliplatin and 64 mg kg⁻¹ for carboplatin, all of them injected intraperitoneally (i.p.) in a single dose. Moreover, other group of rats was treated with a carboplatin dosage of 100 mg kg⁻¹ bw in order to observe a nephrotoxic behavior. Drugs dosages administered are equivalent to clinical treatment protocols [25–27]. All drugs were administered dissolved in saline solution (0.9 % NaCl, Braun Medical S.A, Barcelona, Spain), while control rats were only injected with saline solution. Prior to the sacrifice, urine samples from each rat were collected in metabolic cages over 24 h. All rats were anesthetized and sacrificed 5 days after treatment, when the maximum renal damage has taken place. Blood serum was isolated by centrifugation. Both kidneys from each rat were perfused with ice-cold saline solution and quickly removed. Then, kidneys were frozen in liquid nitrogen and stored at -80 °C until their cryocutting.

Four-micrometer sagittal sections were cryocutted with a commercial cryostat (Thermo Fisher Scientific, HM525 NX) and mounted onto Superfrost Plus slides (Thermo Fisher Scientific, Braunschweig, Germany). Glass slides were kept at -80 °C until LA-ICP-MS measurements. Prior to each analysis, samples were thawed in a desiccator connected to a vacuum pump to avoid H₂O condensation and preserve the spatial resolution of the species.

Histological studies

Parallel 4-μm sagittal sections of rat kidneys were stained with hematoxylin-eosin (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Microphotographs were taken for histological examination using an inverted IX70 microscope (Olympus, Hamburg, Germany).

Renal failure-indicating serum parameters

Creatinine and blood urea nitrogen (BUN) were analyzed in serum using a Dimension RxL autoanalyzer (Dade-Behring, Siemens, Eschborn, Germany). Total protein content in urine was analyzed by using the sulfosalicylic acid method [28].

Printing procedure

A commercial printer Canon iP4950, equipped with a CD holder, was used for printing the samples. Ir-spiked ink was produced on request by Proteome Factory AG (Berlin, Germany). The commercial empty cartridge was filled with the spiked ink with the aid of a syringe. Prior to sample printing, several color test printings were made in conventional DIN A4 paper to purge and equilibrate the printing system. In order to evaluate the robustness of the printing process, nitrocellulose papers were printed in the same manner as tissues before and after the sample printing process. Then, four 25-mm² squares of each nitrocellulose paper were excised, digested by HNO₃/HCl (1:3), the solvent evaporated and finally reconstituted in 2 % (v/v) HCl, and Ir was quantified by direct infusion ICP-MS.

LA-ICP-MS analysis

LA-ICP-MS analyses were carried out with a commercial laser ablation system (New Wave 213, Nd:YAG 213 nm) coupled to a sector field ICP-MS (Element XR, Thermo Fisher Scientific, Germany). Both instruments were synchronized triggering the signal, and He was used as carrier gas to transport the ablated material to the plasma (He flow rate 1 L min⁻¹). The laser energy and line scan overlapping were tuned for complete ablation of the tissue sample, with the following optimized conditions: 35 % laser energy, 20 Hz repetition rate, 150 μm s⁻¹ scan speed, and 100 μm of spot size, with a line scan distance of 80 μm. ICP-MS operating conditions were daily tuned for maximum intensity and oxide ratio (ThO/Th) below 0.7 % using a reference glass slide. Optimal ICP-MS parameters were typically 1350 W RF power, Ar plasma gas 16 L min⁻¹, Ar carrier gas 0.6 L min⁻¹, low resolution mode (m/Δm:300), dwell time 10 ms, and E-Scan scan type. The isotopes monitored in every analysis were ⁶³Cu, ⁶⁵Cu, ⁶⁶Zn, ¹⁹¹Ir, ¹⁹³Ir, ¹⁹⁴Pt, ¹⁹⁵Pt, and ¹⁹⁶Pt.

The analysis of tissue sections (with 12 × 14 mm average dimensions) required about 5 h. Data were treated with MatLab software (MathWorks, Natick, Massachusetts) and exported to Origin 8.5 (OriginLab Corporations, Northampton, MA), where color coded images were produced.

Results and discussion

Internal standardization by tissue printing with Ir-spiked ink

Optimization of the printing process

An even deposition of the ink along the whole tissue is fundamental for a good standardization of the signal. Therefore,

printing process was optimized in control tissues in terms of number of printing cycles and ink density, with a slight heating of the glass slide between cycles for fast drying of the ink. The morphology of the samples was checked before and after the printing procedure without observed changes. The very low heating and water content in the tissue prevent the shift of tissue structures or metal-containing species. Figure 1 shows the LA-ICP-MS images acquired for different printing conditions: (a) five and (b) ten cycles at 20 % printing density and (c) four and (d) two cycles at 50 and 100 % printing density, respectively. The printing homogeneity was estimated integrating the ^{191}Ir signal in small square areas ($n = 10$) (0.25 mm^2) randomly selected inside the tissues and calculating the standard deviation. As can be seen in the figure, regarding the printing homogeneity, there are not big differences comparing all the cases, being the relative standard deviation (RSD) between 1.1 and 2.8 %. Moreover, the printing conditions (c) and (d) provided higher signal intensity than printing conditions (a) and (b). Therefore, four cycles and 50 % density were chosen as compromise conditions to obtain good signal intensity preventing loss of homogeneity or matrix effects due to the overloading of the tissue with ink. Thus, these conditions were further applied for printing all the samples. In this work, iridium has been chosen as internal standard due to its low natural abundance in the kidney (low background), its close ionization potential, and mass compared to Pt, a similar behaviour in the ICP and the lack of potential interferences. It

has to be remarked that another advantage of this methodology is the possibility to employ the most adequate element as internal standard for each analyte of interest.

Figure S1a–d in the Electronic Supplementary Material (ESM) shows the color-coded images produced by plotting the ^{191}Ir signal for the tissues printed. As can be seen by the color scale, the Ir signal inside the tissue seems to be quite homogeneous, while the signal obtained outside the tissue (onto the surface of the glass slide) is not reproducible. The variation of Ir signals for images showed in ESM Fig. S1a–f is attributed to the different day-by-day performance of the instrument, being in agreement the signal differences in the tissues and in the daily TUNE report. In order to explain the difference in the homogeneity inside and outside the tissue, microscope images of the deposition of the ink onto the surface of the glass were recorded, as can be seen in ESM Fig. S1e. As can be observed, the ink is deposited shaped like droplets spread out with different sizes. When this deposition was compared with the deposition achieved when the glass is covered with a gelatin layer (ESM Fig. S1f), an improvement in terms of homogeneity was observed. This fact is because gelatin acts as an absorbent of the ink. Thus, according to our LA-ICP-MS results, the tissue matrix by itself also acts as absorbent of the ink, leading a homogeneous distribution of the ink which is a fundamental requirement for a good standardization.

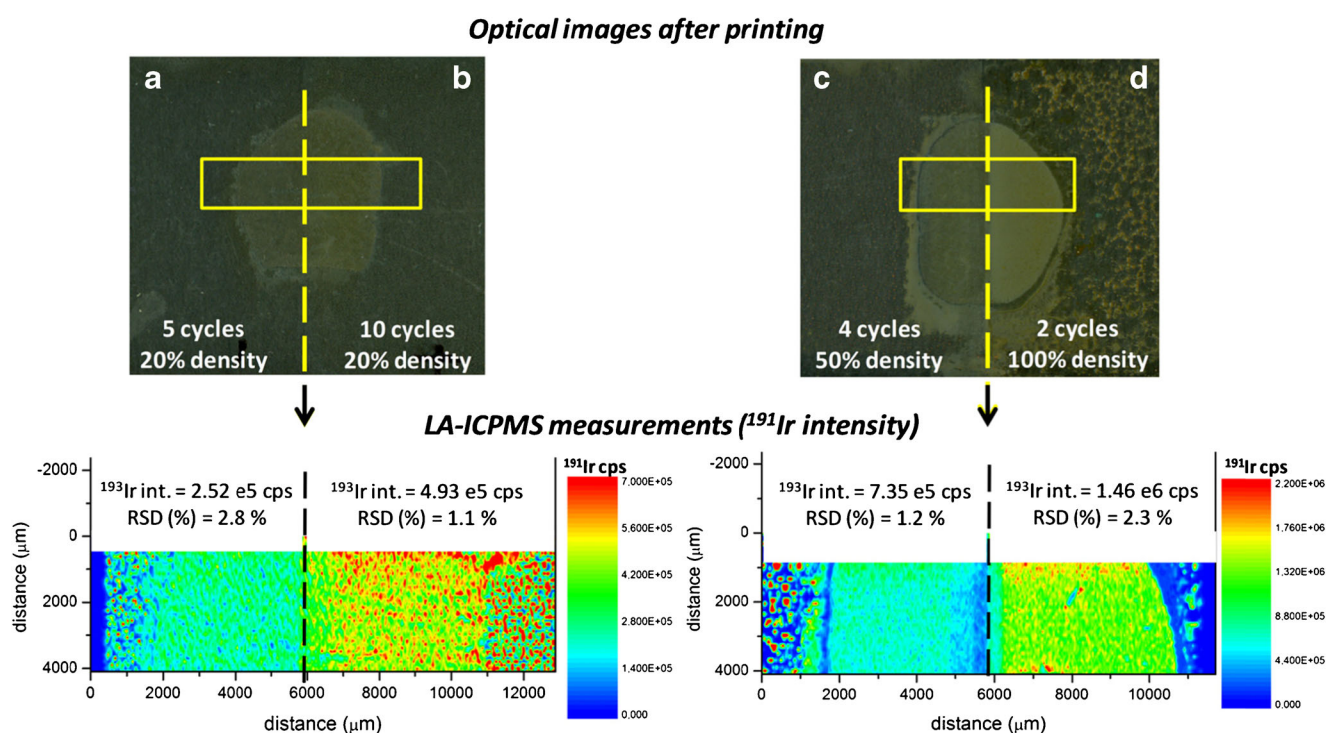


Fig. 1 LA-ICP-MS measurements of ^{191}Ir signal intensities and RSDs obtained in the printing process of two control tissues at the studied printing conditions

Characterization of the on-tissue printing homogeneity

Once the printing conditions were defined, the homogeneity of the internal standard on a cisplatin-treated tissue was characterized. Figure 2 shows the color-coded image obtained by plotting the ^{191}Ir signal acquired by LA-ICP-MS. The distribution of the IS inside the tissue was checked integrating square areas of 1 mm^2 each in different positions of the tissue. First, nine areas were integrated at the same y position and changing the x coordinates (Fig. 2a). The RSD calculated from these nine integrations was lower than 2.5 %. From this study, we can conclude that the homogeneity in the IS printing is quite good in close areas inside the tissue and that no significant differences were observed between cortex and medulla areas. On the other hand, randomly selected square areas ($n=9$) were integrated over the tissue (Fig. 2b). The RSD obtained in this case is lower than 3.5 %, confirming the good signal homogeneity achieved for the IS and demonstrating the feasibility of this approach for bioimaging standardization. The higher standard deviation values in this second experiment probably are due to the laser energy drop during the experiment ($>5\text{ h}$).

In order to check whether the amount of ink along the printing of the tissues was kept constant, two nitrocellulose papers were printed before and after the printing process of all the tissue slices. Then, four 25-mm^2 square areas of each nitrocellulose sample were excised and digested as is described in “[Printing procedure](#)” section. The Ir quantification by direct infusion ICP-MS revealed a high reproducibility and stability of the printing (ESM Table S1). Therefore, the RSD obtained for all the measurements is lower than 5 %, and it is important to be remarked that the deviation comparing the means before and after the printing process is ca. 1 %.

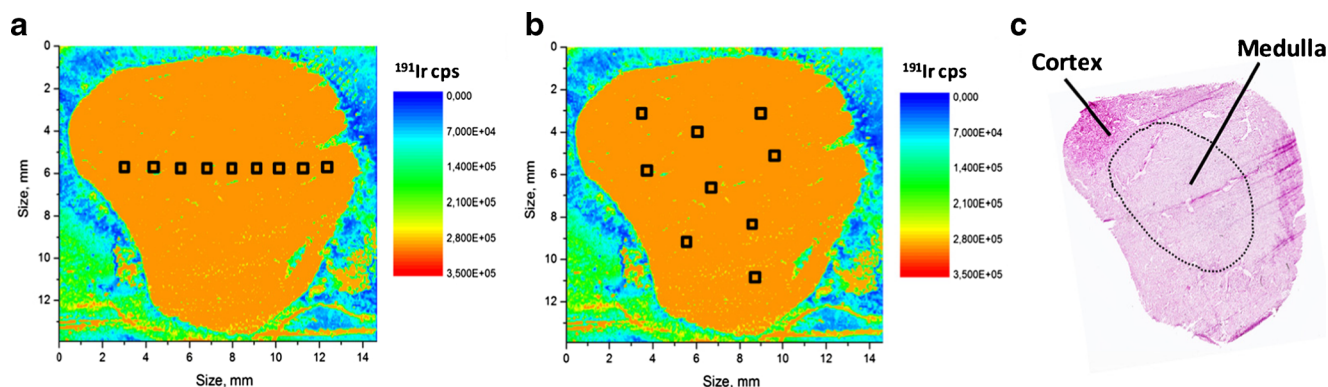


Fig. 2 Color-coded image produced by plotting LA-ICP-MS ^{191}Ir signal intensities from a cisplatin-treated kidney. Evaluation of the homogeneity of the deposition of the ink inside the tissue by integrating 1-mm^2 areas **a** selected in line and **b** randomly selected. **c** HE staining image obtained for

Compensation of drift effects by internal standardization

In order to evaluate if the internal standardization method proposed can compensate instrumental drift effects, a control tissue was measured modifying the ICP-MS tune parameters in order to simulate instrumental sensitivity drifts. Two droplets of a Pt standard (both droplets containing 500 pg of Pt) were deposited onto the surface of a tissue (Fig. 3a), being the sample further printed with the Ir-spiked ink. Then, the measurement was performed using four different tune parameters corresponding to different Y coordinates of the torch. Thus, the instrumental sensitivity dropped over measuring time in four consecutive areas. As can be seen in Fig. 3b, the internal standard signal follows the expected pattern. Moreover, the color-coded image produced by plotting ^{195}Pt signal (Fig. 3c) shows different response of the Pt droplets in correlation with the decreased instrumental sensitivity. However, after image normalization with the Ir signal (Fig. 3d), no significant differences were observed between the four areas of the droplets. This fact pointed out the feasibility of the standardization methodology proposed to compensate instrumental drift effects.

Comparison of kidney tissues treated with Pt-based drugs using printing-based normalization and LA-ICP-MS analysis

Effect of Pt-based drugs on renal function in rats

In order to evaluate the renal damage produced during Pt-based drugs treatments, several renal parameters were measured. As can be seen in Fig. 4, only cisplatin significantly increases serum creatinine and BUN and decreases creatinine clearance in comparison with the controls showing clear kidney damage. Urinary volume and renal hypertrophy were also increased in cisplatin group. No effects were found in these parameters for low

a parallel sagittal section of the same kidney showing the cortical and the medullary area. Tissue ablation was performed from left to right starting on top

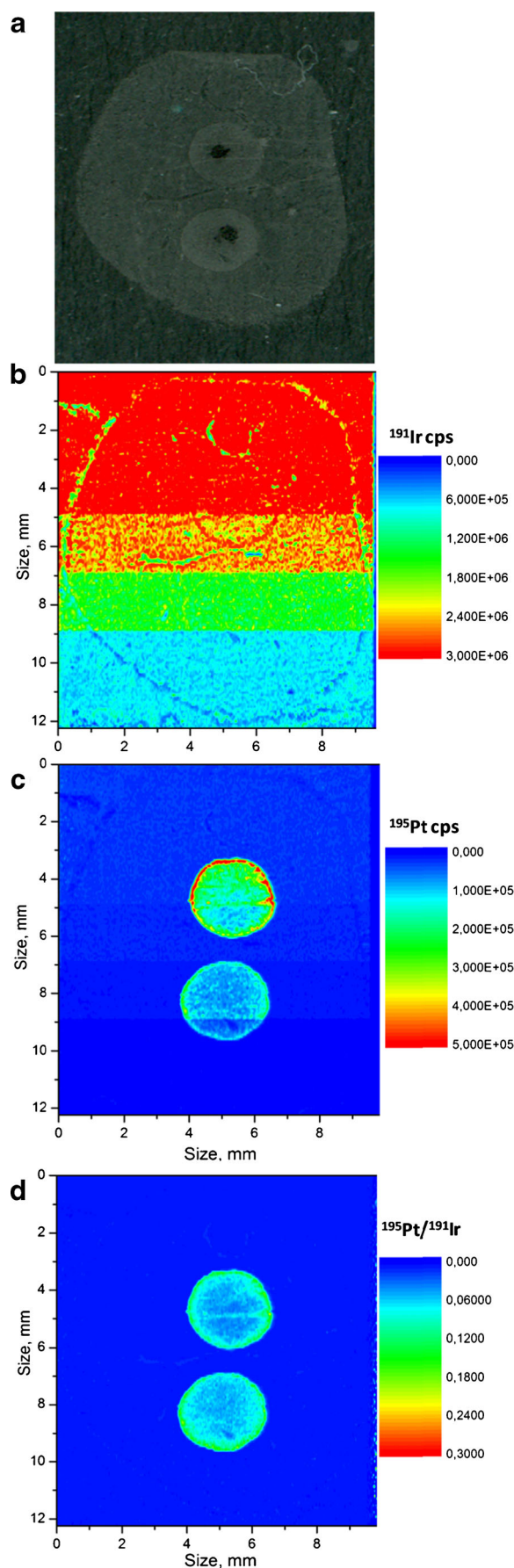


Fig. 3 Evaluation of the compensation of drift effects by internal standardization. Control tissue slice measured using four different tune parameters. **a** Previous scan of the fresh kidney slice where two droplets of 500 pg of a Pt standard have been deposited. Color-coded images produced by plotting LA-ICP-MS **b** ^{191}Ir and **c** ^{195}Pt signal intensities. **d** Normalized image ($^{195}\text{Pt}/^{191}\text{Ir}$) signals. Tissue ablation was performed from left to right starting on top

carboplatin doses and oxaliplatin, which were similar to the found in control animals. Regarding carboplatin administered at 100 mg kg^{-1} , it can be seen that some values are clearly different from controls, but they did not reach statistical significance. Nevertheless, these results indicate that carboplatin can present renal failure at higher dosages, as described in the literature [4].

Kidney damage suffered by the animals during the study was also reflected in body weight at the end of the study. In ESM Table S2, it can be observed that both cisplatin and carboplatin (high doses) treatments dramatically reduce the body weight gain compared to control rats. This effect can be caused by polyuria resulting from tubular injury leading to dehydration, although gastrointestinal toxicity may also be involved [28]. Oxaliplatin did not modify body weight and low carboplatin dose had a minor effect compared to the high dose of carboplatin.

On the other hand, as can be seen in the histological studies showed in ESM Fig. S2, both cisplatin- and carboplatin (at high dose)-injected kidneys present several renal structure differences compared to the control tissue staining. In ESM Figs. S2d and S2h, a marked injury caused by carboplatin (high dose) with loss of intercellular junctions and cellular fragment detachment to the tubule lumen is shown. Moreover, in ESM Fig. S2e–g, several protein casts are shown: cellular fragment detachment to the tubule lumen, vacuolization, and inflammation areas are present for cisplatin-injected kidneys in agreement with previous works [2, 28].

Distribution of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in kidney tissues

The study of the different distribution of Pt-based drugs along the kidney was performed by LA-ICP-MS analysis of kidney slices from rats treated with cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin using clinically reported doses and time periods. For normalization purposes, all kidney slices were printed with the iridium-spiked ink at the optimized printing conditions mentioned before.

Instrumental parameters were optimized in order to achieve a complete tissue ablation, which is mandatory for comparison of the analyzed tissues. Thus, 35 % laser energy and an overlapping of $20 \mu\text{m}$ between line scans were necessary to completely ablate the tissue, since the laser energy in the edges of the laser spot is lower than in the center. Using these

conditions, no ablation of the glass slide is produced preventing the introduction of material different from the sample that could contribute to the matrix and contaminate the sample.

Once the kidney slices were measured, the ^{195}Pt signal was normalized dividing by the ^{191}Ir signal (MatLab software). Finally, normalized images were generated and compared (Origin software). As can be seen in Fig. 5, the comparison of the Pt images obtained revealed several conclusions. First of all, as expected, it can be seen that Pt signal presented in the samples is in accordance to the administered drug dosages. Thus, carboplatin-treated kidney slices (Fig. 5a, b) present higher signals than oxaliplatin and cisplatin-treated slices (Fig. 5c, d). As expected, the high carboplatin dose (Fig. 5b) leads to higher accumulation of platinum in the renal tissue compared to the low dose (Fig. 5a). However, the Pt signal in the tissue is not growing proportionally to the increment in the amount of administered drug. It seems that the accumulation factor increases with the dosage and many explanations, such as deterioration/failure of the drug washing-out or protective mechanisms, are possible. It has to be remarked that the non-homogeneous thickness of the tissue slice produces signal enhancement in some areas of the tissue, as can be seen in the top-right corner of Fig. 5d. This fact could be due to a not precise cryocut of the tissue, as can be appreciated in the HE staining images shown below.

Concerning drug distribution, it can be seen that not only cisplatin but also carboplatin are accumulated mainly in the cortical area, pointing out that nephrotoxic drugs are

distributed following a similar pattern. These distributions were expected to be similar, since it is well known that carboplatin becomes cisplatin once it enter into the blood-stream [29]. These results are in accordance to recent LA-ICP-MS studies, which pointed out that nephrotoxicity could be related with the accumulation of cisplatin in the segment S3 of the proximal renal tubules in the kidney cortical area, mainly affecting renal proximal tubule epithelial cells (RPTECs) [2]. Nephrotoxic behaviors have been reported for both drugs by several authors [1, 4], although in a very different extent. Carboplatin has shown dose-dependent nephrotoxicity in a rat model [4], and it causes time-dependent oxidative renal injury [30]. However, carboplatin-induced nephrotoxicity appears at higher clinical therapeutic doses than cisplatin, probably due to the differences in the pharmacokinetics and pharmacodynamics of both drugs [6].

On the other hand, the distribution observed for oxaliplatin was totally different compared to the other drugs. As can be seen in Fig. 5c, oxaliplatin seems to be homogeneously distributed along the surface of the tissue, revealing that the accumulation of oxaliplatin in the cortex is not specific, and it also reaches the medullary region. In a high extent, this different distribution could be in accordance with the results recently reported by Yonezawa et al. regarding the different transport of Pt-based drugs in the proximal tubular cells of the kidney cortex [3, 31]. While both, cisplatin and oxaliplatin, are accumulated in the kidney cortex by the OCT2-mediated

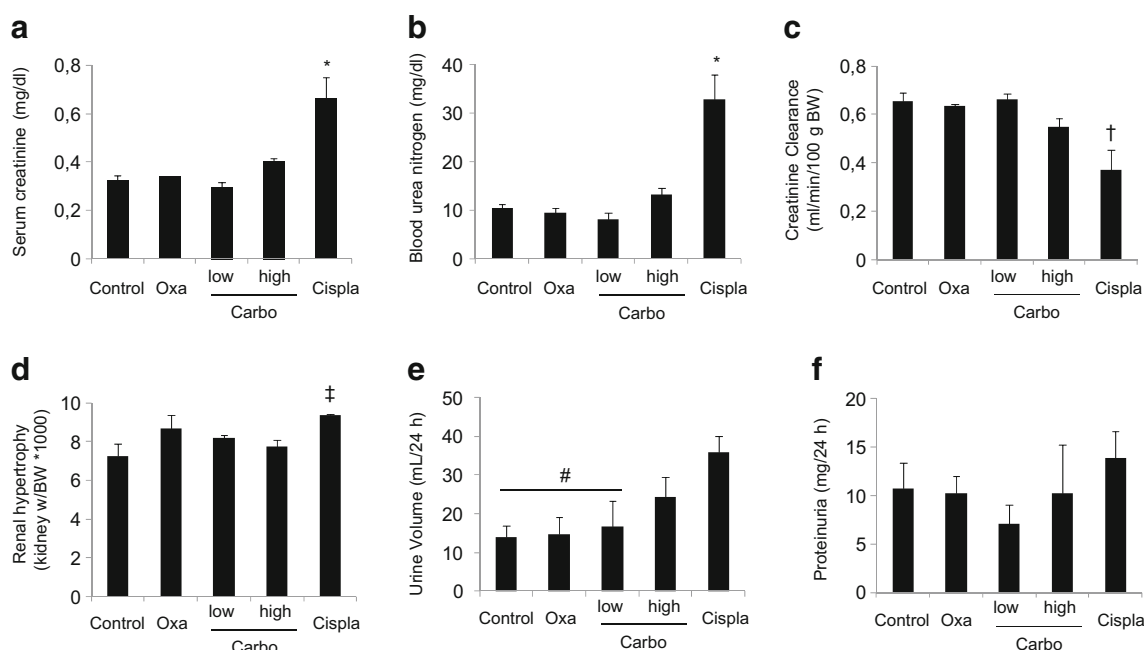


Fig. 4 Renal failure indicating biochemical parameters measured in rats under Pt-based drugs treatment (on day 5 after administration). **a** Serum creatinine. **b** Blood urea nitrogen. **c** Creatinine clearance. **d** Renal hypertrophy. **e** Urine volume. **f** Proteinuria

uptake, cisplatin is slightly extruded by the apical multidrug and toxin extrusion MATE1 transporter, but oxaliplatin is highly transported by MATE2-K and in a lower extend by MATE1, suggesting that the MATE-mediated efflux of the drug from tubular cells protects against potential oxaliplatin accumulation and side effects.

In view of the results obtained, the distribution of the Pt species in the kidney may be related to the nephrotoxicity of the drug. Moreover, accumulation is not exclusively associated with nephrotoxicity, but specific interactions of these drugs with kidney biomolecules are probably essential to understand the toxic and protective mechanisms.

Furthermore, the distribution in the kidney of other elements of interest such as copper and zinc was also studied, in order to compare the results obtained with previous distributions reported for these elements in the kidney [2]. For this purpose, normalized images for ^{65}Cu and ^{66}Zn were generated for all the studied tissues. No significant differences were found with the

previously reported distributions for these elements [2], observing that Cu is mainly distributed in the cortex, and Zn is more evenly distributed along the cortical and medullar areas (ESM Fig. S3).

Accumulation rate of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in kidney tissues

In order to study the accumulation efficiency of the Pt-based drugs in the kidney, the normalized color-coded Pt images from Fig. 5a–d were referred to the amount of administered Pt. As can be seen, the accumulation factor for carboplatin (Fig. 5e, f) is lower than for the other two drugs (Fig. 5g, h). This fact is in accordance with previous works dealing with the Pt content determination in mineralized kidneys [6], where it was observed that the accumulation rate of cisplatin and oxaliplatin was higher than the one of carboplatin using clinical dosages. Moreover, the results could be explained by the fact that carboplatin is not transported into the renal tubular cells by the organic cation transporter OCT2 [32]. Therefore,

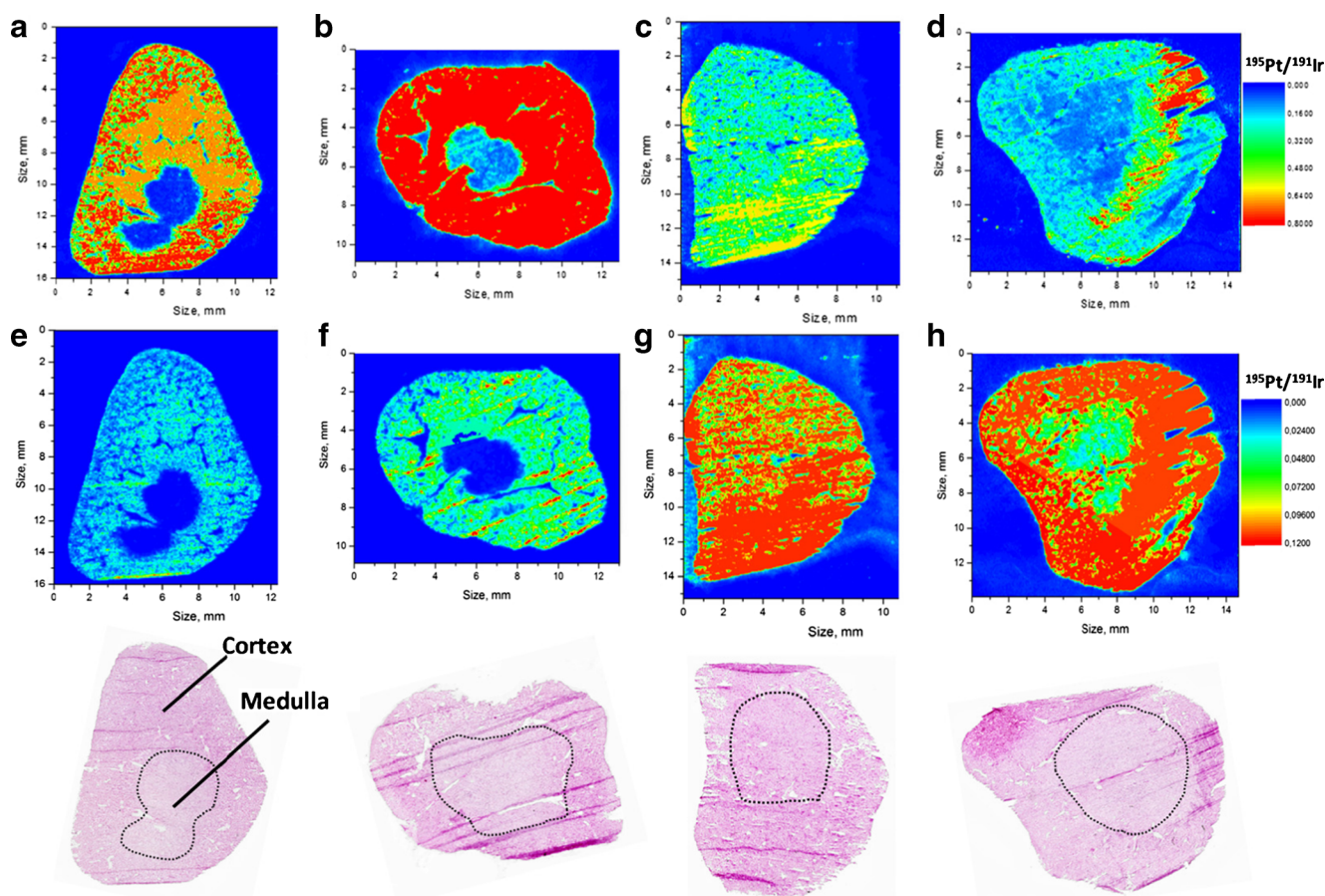


Fig. 5 LA-ICP-MS analysis to study the Pt distribution in kidney slices from rats treated with **a** carboplatin (64 mg kg⁻¹), **b** carboplatin (100 mg kg⁻¹), **c** oxaliplatin (5 mg kg⁻¹), and **d** cisplatin (5 mg kg⁻¹). **a–d** LA-ICP-MS normalized images produced by dividing ^{195}Pt by ^{191}Ir

signal. **e–h** Accumulation rate of the Pt-based drugs. *Below*, HE staining images obtained for parallel sagittal sections of each sample. Tissue ablation was performed from left to right starting on top

its accumulation is lower than for cisplatin and oxaliplatin, which are OCT2 substrates.

Conclusions

The normalization of LA-ICP-MS bioimages by printing a spiked ink onto the surface of tissue samples is revealed as a quick and reliable alternative to other internal standardization methods previously reported. The reproducible and homogeneous deposition of an Ir-spiked ink along kidney slices demonstrated the feasibility of this method to normalize Pt signals acquired by LA-ICP-MS, compensating sample and instrumental drift effects. Moreover, an additional advantage of this methodology is the possibility to use the more adequate elemental internal standard for each application, and even it is possible to spike the ink with as many internal standards as are required. This approach is cheap and easy to carry out, and it is potentially applicable to any kind of biological samples.

This method allowed comparing the distributions of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin along kidneys from rats treated with these cytostatic drugs. Oxaliplatin distribution reveals significant differences compared to the other drugs, which could be related with its different nephrotoxic behavior and uptake/extrusion mechanisms on kidney.

Acknowledgments This work was financially supported by the Ministry of Economy and Competitiveness of Spain (CTQ-2011-24585 and CTQ2014-55711-R). The authors want to thank Dr. Heike Traub for her valuable expertise in laser ablation measurements. I. Moraleja also acknowledges Universidad Complutense of Madrid for a predoctoral fellowship.

Compliance with ethical standards

Competing interest The authors declare that they have no competing interests.

References

1. Yao X, Panichpisal K, Kurtzman N, Nugent K. Cisplatin nephrotoxicity: a review. *Am J Med Sci*. 2007;334:115–24. doi:10.1097/MAJ.0b013e31812dfe1e.
2. Moreno-Gordaliza E, Giesen C, Lázaro A, Esteban-Fernández D, Humanes B, Cañas B, et al. Elemental bioimaging in kidney by LA-ICP-MS as a tool to study nephrotoxicity and renal protective strategies in cisplatin therapies. *Anal Chem*. 2011;83:7933–40. doi:10.1021/ac201933x.
3. Yonezawa A, Inui KI. Organic cation transporter OCT/SLC22A and H⁺/organic cation antiporter MATE/SLC47A are key molecules for nephrotoxicity of platinum agents. *Biochem Pharmacol*. 2011;81:563–8. doi:10.1016/j.bcp.2010.11.016.
4. Husain K, Jagannathan R, Hasan Z, Trammell GL, Rybak LP, Hazelrigg SR, et al. Dose response of carboplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Toxicol*. 2002;91:83–9.
5. Esteban-Fernández D, Gómez-Gómez MM, Cañas B, Verdaguer JM, Ramírez R, Palacios MA. Speciation analysis of platinum antitumoral drugs in impacted tissues. *Talanta*. 2007;72:768–73. doi:10.1016/j.talanta.2006.12.012.
6. Esteban-Fernández D, Verdaguer JM, Ramírez-Camacho R, Palacios MA, Gómez-Gómez MM. Accumulation, fractionation, and analysis of platinum in toxicologically affected tissues after cisplatin, oxaliplatin, and carboplatin administration. *J Anal Toxicol*. 2008;32:140–6.
7. Becker JS. *J Mass Spectrom*. 2013;48:255–68.
8. Becker JS, Matusch A, Wu B. Bioimaging mass spectrometry of trace elements—recent advance and applications of LA-ICP-MS: a review. *Anal Chim Acta*. 2014;835:1–18. doi:10.1016/j.aca.2014.04.048.
9. Lobinski R, Moulin C, Ortega R. *Biochimie*. 2006;88:1591–604.
10. Heeren RMA, McDonnell LA, Amstalden E, Luxembourg SL, Altelaar AFM, Piersma SR. *Appl Surf Sci*. 2006;252:6827–35.
11. Gholap DS, Izmer A, De Samber B, Van Elteren JT, Selih VS, Evens R, et al. *Anal Chim Acta*. 2010;664:19–26.
12. Zoriy M, Matusch A, Spruss T, Becker JS. Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry for imaging of copper, zinc, and platinum in thin sections of a kidney from a mouse treated with cis-platin. *Int J Mass Spectrom*. 2007;260:102–6. doi:10.1016/j.ijms.2006.09.012.
13. Reifschneider O, Wehe CA, Diebold K, Becker C, Sperling M, Karst U. Elemental bioimaging of haematoxylin and eosin-stained tissues by laser ablation ICP-MS. *J Anal At Spectrom*. 2013;28:989–93.
14. Reifschneider O, Wehe CA, Raj I, Ehmcke J, Ciarimboli G, Sperling M, et al. Quantitative bioimaging of platinum in polymer embedded mouse organs using laser ablation ICP-MS. *Metallomics*. 2013;5:1440–7. doi:10.1039/c3mt00147d.
15. Bonta M, Lohninger H, Laszlo V, Hegedus B, Limbeck A. Quantitative LA-ICP-MS imaging of platinum in chemotherapy treated human malignant pleural mesothelioma samples using printed patterns as standard. *J Anal At Spectrom*. 2014;29:2159–67.
16. Egger AE, Theiner S, Kornauth C, Heffeter P, Berger W, et al. Quantitative bioimaging by LA-ICP-MS: a methodological study on the distribution of Pt and Ru in viscera originating from cisplatin- and KP1339-treated mice. *Metallomics*. 2014;6. doi:10.1039/C4MT00072B.
17. Gholap D, Verhulst J, Ceelen W, Vanhaecke F. Use of pneumatic nebulization and laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry to study the distribution and bioavailability of an intraperitoneally administered Pt-containing chemotherapeutic drug. *Anal Bioanal Chem*. 2012;402:2121–9. doi:10.1007/s00216-011-5654-3.
18. Frick DA, Günther D. Fundamental studies on the ablation behaviour of carbon in LA-ICP-MS with respect to the suitability as internal standard. *J Anal At Spectrom*. 2012;27:1294. doi:10.1039/c2ja30072a.
19. Becker JS, Becker JS. Imaging of metals, metalloids, and non-metals by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) in biological tissues. *Methods Mol Biol*. 2010;656:51–82.
20. Austin C, Fryer F, Lear J, Bishop D, Hare D, Rawling T, et al. Factors affecting internal standard selection for quantitative elemental bio-imaging of soft tissues by LA-ICP-MS. *J Anal At Spectrom*. 2011;26:1494. doi:10.1039/c0ja00267d.
21. Austin C, Hare D, Rawling T, McDonagh AM, Doble PJ. *J Anal At Spectrom*. 2010;25:722–5.
22. Konz I, Fernández B, Fernández ML, Pereiro R, González H, Álvarez L, et al. Gold internal standard correction for elemental imaging of soft tissue sections by LA-ICP-MS: element distribution

- in eye microstructures. *Anal Bioanal Chem.* 2013;405:3091–6. doi:10.1007/s00216-013-6778-4.
23. Bellis DJ, Santamaria-Fernandez R. Ink jet patterns as model samples for the development of LA-ICP-SFMS methodology for mapping of elemental distribution with reference to biological samples. *J Anal At Spectrom.* 2010;25:957. doi:10.1039/b926430b.
 24. Hoesl S, Neumann B, Techritz S, Linscheid MW, Theuring F, Scheler C, et al. Development of a calibration and standardization procedure for LA-ICP-MS using a conventional ink-jet printer for quantification of proteins in electro- and Western-blot assays. *J Anal At Spectrom.* 2014;450:1282–91. doi:10.1039/c4ja00060a.
 25. Muldoon LL, Pagel MA, Kroll RA, Brummett RE, Doolittle ND, Zuhowski EG, et al. Delayed administration of sodium thiosulfate in animal models reduces platinum ototoxicity without reduction of antitumor activity. *Clin Cancer Res.* 2000;6:309–15.
 26. Böhm S, Oriana S, Spatti G, Di Re F, Breasciani G, Pirovano C, et al. Dose intensification of platinum compounds with glutathione protection as induction chemotherapy for advanced ovarian carcinoma. *Oncology.* 1999;57:115–20.
 27. Wandt H, Birkmann J, Denzel T, Schafer K, Schwab G, Pilz D, et al. Sequential cycles of high-dose chemotherapy with dose escalation of carboplatin with or without paclitaxel supported by G-CSF mobilized peripheral blood progenitor cells: a phase I/II study in advanced ovarian cancer. *Bone Marrow Transplant.* 1999;23:763–70. doi:10.1038/sj.bmt.1701659.
 28. Humanes B, Lazaro A, Camano S, Moreno-Gordaliza E, Lazaro JA, Blanco-Codesido M, et al. Cilastatin protects against cisplatin-induced nephrotoxicity without compromising its anticancer efficiency in rats. *Kidney Int.* 2012;82:652–63. doi:10.1038/ki.2012.199.
 29. Todd RC, Lippard SJ. Inhibition of transcription by platinum anti-tumor compounds. *Metallomics.* 2009;1:280–91. doi:10.1039/b907567d.
 30. Husain K, Whitworth C, Rybak LP. Time response of carboplatin-induced nephrotoxicity in rats. *Pharmacol Res.* 2004;50:291–300. doi:10.1016/j.phrs.2004.04.001.
 31. Terada T, Inui KI. Physiological and pharmacokinetic roles of H⁺/organic cation antiporters (MATE/SLC47A). *Biochem Pharmacol.* 2008;75:1689–96. doi:10.1016/j.bcp.2007.12.008.
 32. Yonezawa A, Masuda S, Yokoo S, Katsura T, Inui K-I. Cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin, are substrates for human organic cation transporters (SLC22A1-3 and multidrug and toxin extrusion family). *J Pharmacol Exp Ther.* 2006;319:879–86. doi:10.1124/jpet.106.110346.lato.

Analytical and Bioanalytical Chemistry

Electronic Supplementary Material

Printing metal-spiked inks for LA-ICP-MS bioimaging internal standardization: comparison of the different nephrotoxic behavior of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin

Irene Moraleja, Diego Esteban-Fernández, Alberto Lázaro, Blanca Humanes,
Boris Neumann, Alberto Tejedor, M.Luz Mena, Norbert Jakubowski,
M.Milagros Gómez-Gómez

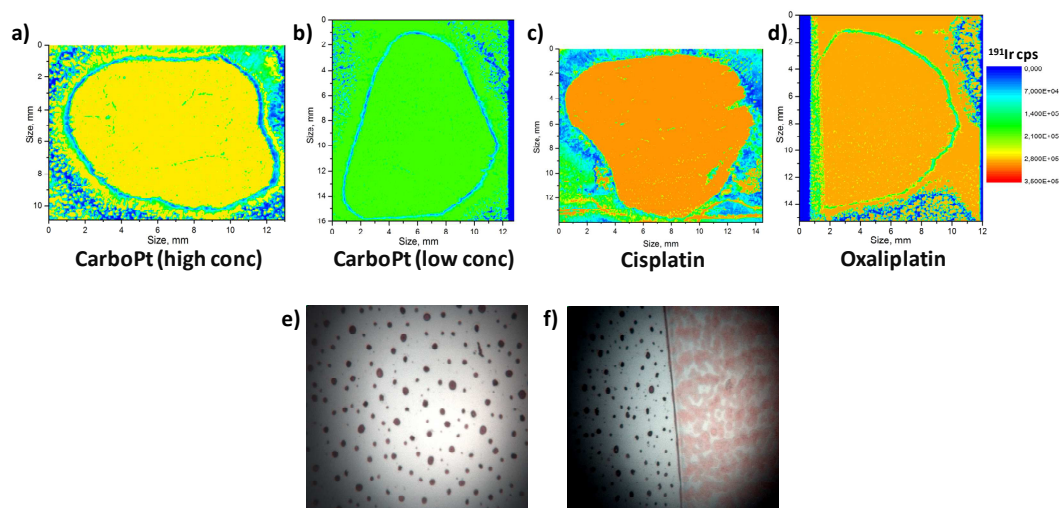


Fig. S1 a-d) Color coded images produced by plotting LA-ICP-MS ^{191}Ir signal intensities from all the studied tissues after Ir-spiked ink printing. Furthermore, microscope images comparing the obtained deposition of the ink onto the surface of the glass slide e) without and f) with gelatin layer (4 cycles at 50% density) is shown. Tissue ablation was performed from left to right starting on top

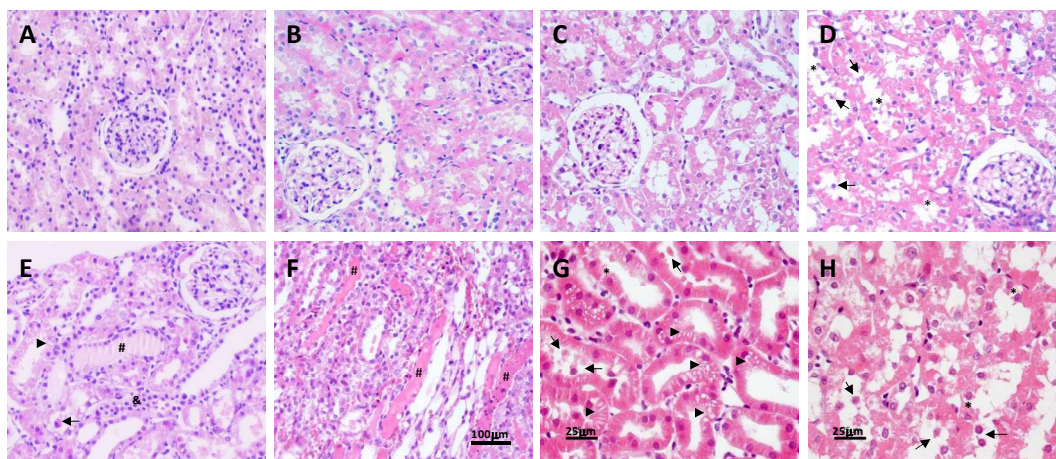


Fig. S2 Representative images of the renal pathology (hematoxylin–eosin staining, magnification x20) on day 5 after administration of Pt-based drugs. (a) Control rats, (b) oxaliplatin (5 mg kg^{-1}), (c) carboplatin (64 mg kg^{-1}), (d) carboplatin (100 mg kg^{-1}), (e,f) cisplatin (5 mg kg^{-1}) (renal cortex and medulla, respectively). Control groups show normal renal structure; cisplatin-injected kidneys show marked injury with sloughing of tubular epithelial cells, loss of brush border, dilation of tubules, vacuolization, and intratubular cast formation (arrows). Bar A-F = $100 \mu\text{m}$. Bar G-H = $25 \mu\text{m}$. (g, h) Details of renal tubules of cisplatin and carboplatin high dose respectively, showing the presence of vacuolization (triangles) and cellular fragments detachment to the tubules lumen (arrows)

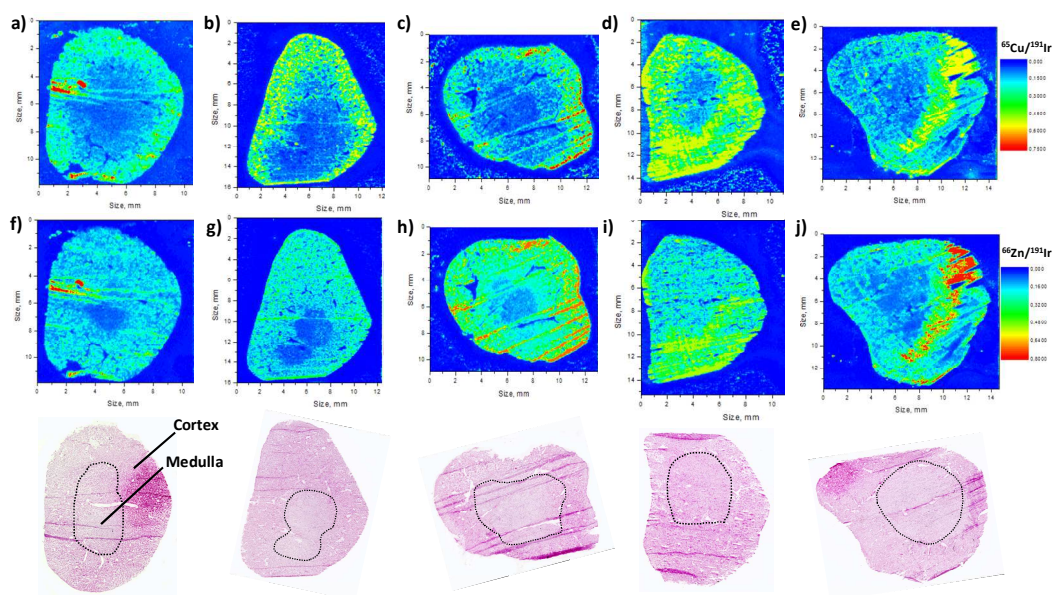


Fig. S3 LA-ICP-MS analysis to study the Cu and Zn distribution in kidney slices from rats treated with b,g) carboplatin (64 mg kg^{-1}), c,h) carboplatin (100 mg kg^{-1}), d,i) oxaliplatin (5 mg kg^{-1}) and e,j) cisplatin (5 mg kg^{-1}). a,f) Control tissues. All the images are LA-ICP-MS normalized images produced by dividing ^{65}Cu or ^{66}Zn by ^{191}Ir signal. Below, HE staining images obtained for parallel sagittal sections of each sample. Tissue ablation was performed from left to right starting on top

Table S1 Total Ir content determination of nitrocellulose printed samples by direct infusion ICP-MS. Square areas of 25 mm² (n = 8) were mineralized and analyzed for the two nitrocellulose sheets printed with the Ir-spiked ink before (S1-S4) and after (S5-S8) the printing process of the tissues, respectively

Square	Total Ir (ng)	Average	Std Desviation	RSD (%)
S1	15,05	15,66	0,74	4,73
S2	16,74			
S3	15,51			
S4	15,35			
S5	14,77	15,29	0,53	3,49
S6	14,90			
S7	15,66			
S8	15,83			

Table S2 Effect of platinum-based antineoplastic drugs on body weight in rats. The table shows body weight in the different study groups at the beginning and end of the study. Results are expressed as mean \pm SEM (standard error of the mean); n= 3 animals per group. ^aP< 0.05 vs. control; ^bP< 0.01 vs. oxaliplatin; ^cP< 0.02 vs. carboplatin high

Groups	Initial weight (g)	Final weight (g)	Δ weight (g)
Control	287 \pm 16	306 \pm 22	19 \pm 6
Oxaliplatin	268 \pm 3	280 \pm 3	12 \pm 3
Carboplatin low	272 \pm 9	263 \pm 1	-9 \pm 10 ^{a,c}
Carboplatin high	366 \pm 3	319 \pm 1	-47 \pm 2 ^{a,b}
Cisplatin	285 \pm 29	253 \pm 13	-32 \pm 16 ^{a,b}

Trabajo 7

Isotope dilution analysis for the absolute quantification of metal contents in tissues by LA-ICP-IDMS

Analytical Chemistry (2017), (bajo revisión)

Este trabajo fue presentado como Comunicación Oral en el congreso “Colloquium Spectroscopicum Internationale XXXIX” celebrado en septiembre de 2015 en Figueira da Foz, Coimbra, Portugal

This document is confidential and is proprietary to the American Chemical Society and its authors. Do not copy or disclose without written permission. If you have received this item in error, notify the sender and delete all copies.

Isotope dilution analysis for the absolute quantification of metal contents in tissues by LA-ICP-IDMS

Journal:	<i>Analytical Chemistry</i>
Manuscript ID	Draft
Manuscript Type:	Article
Date Submitted by the Author:	n/a
Complete List of Authors:	Moraleja, Irene; Universidad Complutense de Madrid, Analytical Chemistry Mena, Maria; Universidad Complutense de Madrid, Analytical Chemistry Lazaro, Alberto; Hospital Gregorio Marañón Neumann, Boris; Proteome Factory AG Tejedor, Alberto; Hospital Gregorio Marañón Jakubowski, Norbert; BAM Federal Institute for Materials Research and Testing Gomez, Milagros; Universidad Complutense de Madrid, Analytical Chemistry Esteban-Fernández, Diego; Federal Institute for Materials Research and Testing, Inorganic Trace Analysis

SCHOLARONE™
Manuscripts

I. Moraleja¹, M.L. Mena¹, A. Lázaro³, B. Neumann⁴, A. Tejedor³, N. Jakubowski², M.M. Gómez-Gómez^{1*†}, D. Esteban-Fernández^{2*†}

¹Department of Analytical Chemistry, Faculty of Chemistry, Universidad Complutense de Madrid, Avda. Complutense s/n, 28040 Madrid, Spain

²BAM Federal Institute for Materials Research and Testing, Richard-Villstätter-Str. 11, 12489 Berlin, Germany

³Renal Physiopathology Laboratory, Dept. of Nephrology, Instituto de Investigación Sanitaria Gregorio Marañón, Hospital General Universitario Gregorio Marañón, 28007 Madrid, Spain

⁴Proteome Factory AG, Magnusstrasse 11, 12489 Berlin, Germany

† Both senior authors contributed equally

*Corresponding authors: M.M. Gómez-Gómez, mmgomez@ucm.es, Diego Esteban-Fernández, diesteban77@yahoo.es

Abstract

Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS) has been revealed as the most convenient technique for trace elemental bioimaging in tissue sections, providing elemental 2D distribution at a quantitative level. For quantification purposes, in the last years several approaches have been proposed in the literature such as the use of CRMs or matrix matched standards. The use of Isotope Dilution (ID) for quantification by LA-ICP-MS has been also described, being mainly useful for bulk analysis but not feasible for spatial measurements so far. In this work, a quantification method based on ID analysis was developed by printing isotope-enriched inks onto kidney slices from rats treated with antitumoral Pt-based drugs using a commercial ink-jet device, in order to perform an elemental quantification in different areas from bio-images. The methodology was validated by deposition of natural Pt standard droplets with a known amount of Pt onto the surface of a control tissue, where could be quantified even 50 pg of Pt, with recoveries higher than 90%. The amount of Pt present in the whole kidney slices was quantified for cisplatin, carboplatin and oxaliplatin-treated rats. The results obtained were in accordance with those previously obtained. The amount of Pt distributed between the medullar and cortical areas was also quantified, observing different behavior for the three drugs.

INTRODUCTION

LA-ICP-MS elemental imaging of biological samples was first described by Wang *et al.* in 1991¹, and since then the number of applications have greatly increased due to the

emergent interest in tissue elemental distributions. LA-ICP-MS technique presents numerous advantages such as high sensitivity (typical limits of detection at the $\mu\text{g g}^{-1}$ range), wide dynamic range (up to 9 orders of magnitude), multi-elemental capability, molecule structure independent response and high spatial resolution in the lower μm range. However, the lack of certified materials prevents the reliable elemental quantification by two-dimensional mapping of target isotopes.

In order to obtain comparable LA-ICP-MS images, internal standardization is required to normalize the acquired bio-images compensating sample matrix or instrumental drift effects. Several internal standardization methods have been reported, such as the employment of matrix elements as reference (as the ^{13}C signal)^{2,3} or the deposition of polymeric layers on or beneath the tissue slices⁴. Recently, novel and robust internal standardization methodologies have been described including the coating of the sample surface with metallic films such as gold⁵ or spiked inks printed with commercial ink-jet printers^{6,7}. However, these approaches cannot provide absolute quantitative information.

With respect to signal calibration by LA-ICP-MS, the main issue is how to introduce calibrants in the sample matrix avoiding elemental fractionation. The standards must match the sample matrix to reduce differences in non-stoichiometric effects during vaporization, transport of the ablated material and plasma ionization. To overcome this challenge, several quantification strategies have been described in the last years, such as the quantification via external calibration by employing matrix-matched standards and CRMs⁸. Herein, Becker *et al.* were the first to apply custom laboratory prepared standards for quantitative imaging by LA-ICP-MS⁹. In most cases, matrix-matched standards were made of tissue homogenate¹⁰, gelatin¹¹ or synthetic polymers^{12,13} spiked with known amounts of a standard. Moreover, the online addition of standard solutions to the ablation chamber has been investigated as a possible means for quantification¹⁴. However, this technique present important drawbacks such as the decreased sensitivity (between 20 and 35%) due to the dilution of the ablated material, and elemental fractionation effects as consequence of differences between the matrix of the standards and the sample.

It is well known the high performance of isotope dilution mass spectrometry (IDMS) for elemental analysis, providing absolute quantitative analysis (isotope dilution analysis: IDA) without the need of internal standardization. IDMS has been also reported for LA-ICP-MS quantification. Methodologies employing pressed pellets¹⁵ or online addition of the spiked standards^{14,16} have been described in the literature. However, the accurate and easy application of IDMS to elemental quantification in bulk analysis is hampered due to complicated sample preparation and elemental fractionation effects in post-ablation additions.

In this work, for the first time a LA-ICP-MS quantification approach is presented using IDA with spikes in solid state on tissue samples. For this purpose, isotope-enriched inks will be printed onto kidney slices from rats treated with anti-tumoral Pt-based drugs using a commercial ink-jet device. Pt concentration in different areas of the kidney will be compared for three different drugs. The proposed strategy is simple and could reduce the elemental fractionation. Some other approaches using post-ablation addition of the standards are not considering the variations due to ablation and transport effects, leading to important deviations respect the real value¹⁷. Moreover, the methodology proposed could take advantage of the dry plasma, which provides improved atomization and reduces the matrix effects. On the other hand, the use of liquid standards (spiked ink) has important advantages such as availability and easy handling (dilution or doping). With the proposed ink-jet based method we have at the same time the advantages of both approaches. The proposed methodology will be validated by means of depositing natural Pt standard droplets with a known amount of Pt onto the surface of a control tissue.

MATERIALS AND METHODS

Reagents

High-purity HNO₃ and HCl, as well as the standard solution of natural platinum (1000 mg L⁻¹) were purchased from Merck (Darmstadt, Germany). The isotopically enriched ¹⁹⁴Pt standard was supplied by Chemotrade GmbH (Dusseldorf, Germany). Isotopically enriched Pt-spiked ink was supplied by Proteome Factory AG (Berlin, Germany). Cisplatin, carboplatin and oxaliplatin were purchased from Sigma Aldrich Chemie (St. Louis, MO, USA). All solutions were prepared employing ultrapure water (Milli-Q Ultra-pure water systems, Millipore, USA).

Animal treatment and tissue slices preparation

Animal studies were conducted in the Medicine and Experimental Surgery Unit of the Hospital General Universitario Gregorio Marañón (HGUGM, Madrid, Spain) as is described elsewhere⁷. All the procedures were approved by the Ethic Committee on Animal Experimentation from the HGUGM and animals were handled and cared for in accordance with Directive 2010/63/EU and Spanish Royal Decree 53/2013 on the protection of animals used for experimentation and other scientific purposes. Dosages were administered dissolved in saline solution (0.9% NaCl, Braun Medical S.A, Barcelona, Spain) and injected intraperitoneally (i.p.) in a single dose, being 5 mg kg⁻¹ body weight (bw) for both cisplatin and oxaliplatin and 64 and 100 mg kg⁻¹ for carboplatin. Control rats were only injected with saline

1
2
3 solution. 5 days after treatment (when the maximum renal damage has taken place) all rats
4 were anesthetized and sacrificed. Both kidneys from each rat were perfused with ice-cold
5 saline solution and quickly removed. Then, kidneys were frozen in liquid nitrogen and stored at
6 -80°C until their cryo-cutting with a commercial cryostat (Thermo Fisher Scientific, HM525 NX)
7 into 4- μm sagittal sections, and mounted onto Superfrost Plus slides (Thermo Fisher Scientific,
8 Braunschweig, Germany). Glass slides were kept at -80°C until LA-ICP-MS measurements. In
9 order to avoid H_2O condensation and preserve the spatial resolution of the species, samples
10 were thawed in a desiccator connected to a vacuum pump for fast drying prior to each
11 analysis.
12
13
14
15
16
17
18

19 Tissue printing with isotope-enriched inks

20 The printing process was performed as previously described by Moraleja *et al.*⁷
21 Isotopically enriched ^{194}Pt -spiked ink was produced on request by Proteome Factory AG
22 (Berlin, Germany). Sample printing was performed with the optimal conditions previously
23 reported: four cycles at 50% of printing density. In order to calculate the concentration of the
24 Pt-containing ink per area unit, nitrocellulose papers were printed in the same manner as
25 tissues before and after the sample printing process. Then, five 23.7 mm² circles of each
26 nitrocellulose paper were punched, digested with HNO_3 : HCl (1:3), evaporated and finally
27 reconstituted in 2% (v/v) HCl , being the isotopes ^{194}Pt , ^{195}Pt and ^{196}Pt further quantified by
28 direct infusion ICP-MS.
29
30
31
32
33
34
35
36

37 LA-ICP-MS measurements

38 Isotopes ^{194}Pt , ^{195}Pt and ^{196}Pt were measured with a NWR213 laser ablation system
39 (ESI, Fremont, USA) coupled to a sector field ICP-MS (Element XR, Thermo Fisher Scientific,
40 Bremen, Germany) as is described elsewhere⁷. Both instruments were synchronized triggering
41 the signal and He was used as carrier gas to transport the ablated material to the plasma (He
42 flow rate 1 L min⁻¹). Complete ablation of the tissue sample was done using the following
43 conditions: 37 to 40% increasing laser energy, and line scan distance of 80 μm . Other LA
44 experimental parameters were: 20 Hz repetition rate, 150 $\mu\text{m s}^{-1}$ scan speed, and 100 μm of
45 spot size. The ICP-MS operating conditions were daily tuned using a reference glass slide for
46 maximum ^{137}Ba and ^{238}Th intensity, and oxide ratio (ThO/Th) below 0.7%. Optimal ICP-MS
47 parameters were typically 1350 W RF power, Ar plasma gas 16 L min⁻¹, Ar carrier gas 0.6 L min⁻¹,
48 low resolution mode ($m/\Delta m$:300), dwell time 10 ms, and E-Scan scan type.
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

The analysis of the whole tissue sections (200 mm² approximately) required about 5 hours. Raw data points were converted to pixels with MatLab software (MathWorks, Natick, Massachusetts) and exported to Origin 8.5 (OriginLab Corporations, Northampton, MA), where color-coded images were produced. Images integration was conducted by the software Image.

Quantification using IDA

The concentration of the Pt present in the sample was calculated using standard equations for IDA¹⁸. A 10 mg mL⁻¹ solution of the isotope-enriched Pt standard was prepared from the raw material¹⁹ and added to the commercial ink following the optimized protocol elaborated by Proteome Factory AG (Berlin, Germany). The ¹⁹⁴Pt printed concentration was determined by mineralization of printed nitrocellulose membranes as described above. All solutions and reagents were carefully weighed with a high precision balance able to read 0.00001 g (Sartorius). The isotope ratio ¹⁹⁴Pt to ¹⁹⁶Pt was used for IDA calculations. Mass bias correction factor was determined every day by direct infusion of 1 µg L⁻¹ natural Pt standard solution. The exponential model was used for the correction of the mass discrimination.

RESULTS AND DISCUSSION

Validation of the proof of concept

The first aim of this work was to validate the proposed LA-ICP-IDMS approach based on the printing of isotope-enriched inks. For this purpose, droplets of a natural Pt standard of increasing concentration were deposited onto the surface of three control tissues and left to air dry. Six different droplets ranging from 5 to 500 pg of Pt were deposited on top of each tissue sample. All the solutions needed for the preparation of the standards as well as the droplets deposited onto the tissues, were weighed in an analytical balance to accurately control the amount of deposited Pt. Then, tissues were printed with the isotope-enriched spiked-ink following the protocol described in "Materials and Methods" section. After LA-ICP-MS analysis, color-coded images were produced by plotting ¹⁹⁴Pt and ¹⁹⁶Pt signal intensities by Origin software. **Figure 1a** shows the homogeneity of the ¹⁹⁴Pt enriched isotope in the printed tissue. **Figure 1b** shows the deposited droplets with increasing concentrations of natural Pt.

For ID calculations, the Pt spike mass amount in the tissue has to be known. For this purpose, two nitrocellulose papers were printed before and after every printing session. Then, five 23.7 mm² circles of each nitrocellulose paper were punched and digested as is described in "Tissue printing with isotope-enriched inks" section. The Pt quantification by direct infusion ICP-IDMS revealed a concentration of the enriched spike of 29.2±1.4 pg of ¹⁹⁴Pt per mm²,

showing a high reproducibility ($n=10$, $RSD < 5\%$) and stability of the printing process. Similar reproducibility was observed in the printed tissue where the integrated areas ($n=10$) inside the tissue (**Fig 1a**, outside the droplets) offer a relative standard deviation around 2-3%.

The selected isotopes for ID calculations were ^{194}Pt and ^{196}Pt because they show the highest ratio difference between the spike and the natural Pt (as shown in **Table 1**). Integration of ^{194}Pt and ^{196}Pt signals for the areas of the droplets was carried out by the software ImageJ (<http://rsbweb.nih.gov/ij/>), and the mass amount of natural Pt was calculated by ID analysis. As can be seen in **Figure 2**, experimental Pt amounts are very close to the theoretical deposited amounts, being the measurement error lower than 10% for all the droplets higher than 5 pg and lower than 3% for many of them. These excellent results pointed out the suitability of the developed methodology to perform an elemental quantification in different areas from bio-images. It has to be remarked that the calculations for the 5 pg droplets were not accurate due to the fact that the calculated isotope ratio signal was very close to the isotope ratio of the pure spike.

Quantification of Pt-based drugs in kidney tissues

Kidney slices from rats treated with the three anti-tumoral drugs studied were printed with the isotope-enriched ink and tissues were measured by LA-ICP-MS as is previously described in “*Materials and Methods*” section. Once the color-coded images were produced by plotting ^{194}Pt and ^{196}Pt signal intensities by Origin software (**Figure 3**), images were integrated by ImageJ software. **Figures 3a-d** show the homogeneity of the ^{194}Pt enriched isotope in the printed tissues achieved, which is a crucial point for a reliable quantification.

Quantifications of the amount of Pt in the kidney slices were carried out by ID analysis. **Table 2** shows the Pt concentrations found in the kidneys treated with the three drugs studied, taking into account the weight of the kidneys and kidney slices. Regarding cisplatin-treated rats, the amount of Pt calculated was 28.55 mg per kg of dried tissue, which is in the order (considering the expected variance among animals) of the value previously reported by Moreno-Gordaliza *et al.*²⁰, who performed a pseudo-quantification by means of an external calibration obtaining 42 mg of Pt in a kidney from a 5 mg kg^{-1} cisplatin-treated rat. Furthermore, it has to be remarked that results obtained are very close to the values obtained by Esteban-Fernández *et al.*²¹, who reported an amount of 33.3 mg kg^{-1} by an accurate quantification by direct nebulization ICP-MS analysis of digested kidneys. Regarding oxaliplatin, a similar amount of Pt accumulated was observed (25.43 mg kg^{-1}). However, and according to the higher dosages administered, carboplatin-impacted kidneys presented higher amounts of Pt: 50.81 and 105.20 mg kg^{-1} for both treatments of 64 and 100 mg kg^{-1} , respectively. It has to

be remarked that it is the first time that the comparison of the accumulation of these drugs is studied with an imaging technique employing an absolute quantification approach.

The accumulation rate was calculated referring the milligrams of Pt accumulated in the kidney to the milligrams of Pt administered in each treatment. As can be observed in **Table 2**, results obtained pointed out the high accumulation level of cisplatin and oxaliplatin, being their accumulation rate approximately 5-fold higher than the accumulation rate for carboplatin injected at a high dosage. The accumulation rates obtained showed the same trend as those reported by Esteban-Fernández *et al.* for digested kidneys²¹ and agree with the higher reactivities reported for cisplatin and oxaliplatin compared to carboplatin²², as was reported in the literature.

Regarding the Pt distribution between cortical and medullar areas, **Figure 4** shows the results obtained. As can be seen, cisplatin and carboplatin are localized mainly in the cortex, presenting a pronounced difference in the amount of Pt contained in both areas. Regarding oxaliplatin, the difference between both areas is very low, being even higher the amount of Pt in the medulla. Since the nephrotoxicity induced by cisplatin has been reported to be related with the accumulation of the drug in the cortical area, affecting mainly to the renal proximal tubule epithelial cells (RPTECs), the different distribution of oxaliplatin could explain the no nephrotoxic behavior of this drug. It also may be related with the higher transport of oxaliplatin from the cortex to the medulla mediated by the transporters MATE²³ compared with the transport of cisplatin by this transporter. Comparing cisplatin and carboplatin, the lower amount of Pt on carboplatin-impacted kidneys present in the medulla could be also explain by their different molecular transport, since carboplatin is not substrate of the transporters OCTs and MATE²³. It has to be remarked that these distributions observed between the three drugs are in accordance with previously results reported in our group.⁷ Nevertheless, in this work, the differences in the distribution have been quantified for the first time with an imaging technique using an absolute quantification approach.

CONCLUSIONS

A methodology to obtain simultaneously Pt signal distribution and quantitative information by printing isotope-enriched inks onto kidney slices and further analysis by LA-ICP-IDMS has been evaluated. The excellent results obtained have demonstrated the possibility to perform an absolute elemental quantification in different areas of tissue slices with higher sensitivity than other reported methods, quantifying even 50 pg of Pt. Quantification of lower amounts such as the droplets of 5 pg of Pt deposited were not too accurate, due to the fact that the calculated isotope ratio was very close to the isotope ratio of the pure spike. To solve

this problem, further experiments with inks containing lower amount of spike would be afforded. The approach proposed is cheap and easy to carry out, with a potential application to any kind of tissues.

This method allowed comparing directly on tissues the absolute amount of Pt accumulated in cisplatin, carboplatin and oxaliplatin-impacted kidneys, and their distributions among medullar and cortical areas. The similar amount of oxaliplatin present in cortical and medullar areas (totally different to cisplatin and carboplatin distribution) could be related with its no nephrotoxic behavior.

The good results obtained point out the suitability of the methodology to perform an elemental quantification in different areas from bio-images, being the first time that it has been made quantification in bioimaging with an absolute quantification technique.

Acknowledgements

This work was financially supported by the Ministry of Economy and Competitiveness of Spain (CTQ-2011-24585 and CTQ-2014-55711-R). I. Moraleja also acknowledges Complutense University of Madrid for a predoctoral fellowship.

References

- (1) Wang, S.; Brown, R.; Gray, D. . *Appl. Spectrosc.* **1994**, *48*, 1321–1325.
- (2) Austin, C.; Fryer, F.; Lear, J.; Bishop, D.; Hare, D.; Rawling, T.; Kirkup, L.; McDonagh, A.; Doble, P. J. *Anal. At. Spectrom.* **2011**, *26* (7), 1494.
- (3) Hare, D. J.; Lee, J. K.; Beavis, A. D.; Van Gramberg, A.; George, J.; Adlard, P. a.; Finkelstein, D. I.; Doble, P. a. *Anal. Chem.* **2012**, *84* (9), 3990–3997.
- (4) Austin, Christine, Hare, Dominic, Rawling, Tristan, Mc Donagh, Andrew M, Doble, P. J. *Anal. At. Spectrom.* **2010**, *25* (5), 722–725.
- (5) Konz, I.; Fernández, B.; Fernández, M. L.; Pereiro, R.; González, H.; Álvarez, L.; Coca-Prados, M.; Sanz-Medel, A. *Anal. Bioanal. Chem.* **2013**, *405*, 3091–3096.
- (6) Hoesl, S.; Neumann, B.; Techritz, S.; Linscheid, M. W.; Theuring, F.; Scheler, C.; Jakubowski, N.; Mueller, L. J. *Anal. At. Spectrom.* **2014**, *450*, 1282–1291.
- (7) Moraleja, I.; Esteban-Fernández, D.; Lázaro, A.; Humanes, B.; Neumann, B.; Tejedor, A.; Mena, M. L.; Jakubowski, N.; Gómez-Gómez, M. M. *Anal. Bioanal. Chem.* **2016**.
- (8) Hare, D.; Austin, C.; Doble, P. *Analyst* **2012**, *137*, 1527.
- (9) Becker, J. S.; Zoriy, M. V; Pickhardt, C.; Zilles, K. *Anal. Chem.* **2005**, *77* (10), 3208–3216.
- (10) Zoriy, M.; Matusch, A.; Spruss, T.; Becker, J. S. *Int. J. Mass Spectrom.* **2007**, *260* (2–3), 102–106.

- (11) Gholap, D.; Verhulst, J.; Ceelen, W.; Vanhaecke, F. *Anal. Bioanal. Chem.* **2012**, 402 (6), 2121–2129.
- (12) Reifschneider, O.; Wehe, C. a; Raj, I.; Ehmcke, J.; Ciarimboli, G.; Sperling, M.; Karst, U. *Metallomics* **2013**, 5 (10), 1440–1447.
- (13) Köppen, C.; Reifschneider, O.; Castanheira, I.; Sperling, M.; Karst, U.; Ciarimboli, G. *Metallomics* **2015**.
- (14) Pickhardt, C.; Izmer, A. V; Zoriy, M. V; Schauml, D.; Becker, J. S. *Int. J. Mass Spectrom.* **2006**, 248, 136–141.
- (15) Tibi, M.; Heumann, K. G. *Anal. Bioanal. Chem.* **2003**, 126–131.
- (16) Becker, J. S.; Pickhardt, C.; Pompe, W. *Int. J. Mass Spectrom.* **2004**, 237, 13–17.
- (17) Traub, H.; Wälle, M.; Koch, J.; Panne, U.; Matschat, R.; Kipphardt, H.; Günther, D. *Anal. Bioanal. Chem.* **2009**, 395 (5), 1471–1480.
- (18) Rodríguez-González, P.; Marchante-Gayón, J. M.; García Alonso, J. I.; Sanz-Medel, A. *Spectrochim. Acta - Part B At. Spectrosc.* **2005**, 60 (2), 151–207.
- (19) Ziehe, M.; Esteban-Fernández, D.; Hochkirch, U.; Thomale, J. J.; Linscheid, M. W. *Metallomics* **2012**, 4 (10), 1098–1104.
- (20) Moreno-Gordaliza, E.; Giesen, C.; Lázaro, A.; Esteban-Fernández, D.; Humanes, B.; Cañas, B.; Panne, U.; Tejedor, A.; Jakubowski, N.; Gómez-Gómez, M. M. *Anal. Chem.* **2011**, 83, 7933–7940.
- (21) Esteban-Fernández, D.; Verdaguer, J. M.; Ramírez-Camacho, R.; Palacios, M. a; Gómez-Gómez, M. M. *J. Anal. Toxicol.* **2008**, 32 (2), 140–146.
- (22) Go, R.; Adjei, A. *J. Clin. Oncol.* **1999**, 17, 409–422.
- (23) Yokoo, S.; Yonezawa, A.; Masuda, S.; Fukatsu, A.; Katsura, T.; Inui, K. I. *Biochem. Pharmacol.* **2007**, 74 (3), 477–487.

FIGURE CAPTIONS

Figure 1. Color coded images produce by plotting LA-ICP-MS a) ^{194}Pt and b) ^{196}Pt signal intensities from control kidneys where droplets of a standard natural Pt solution were deposited onto the surface and finally were printed with the spiked ink. Theoretical amounts of Pt in the droplets are 5, 50, 100, 200, 350 and 500 pg from left to right starting on top (n=3)

Figure 2. Recoveries of Pt obtained after LA-ICP-IDMS analysis of the droplets of a standard natural Pt solution deposited onto the surface of control kidneys. Theoretical amounts of Pt in the droplets are 5, 50, 100, 200, 350 and 500 pg (n=3)

Figure 3. Colour coded images produced by plotting LA-ICP-MS ^{194}Pt and ^{196}Pt signal intensities from kidneys from rats treated with a) cisplatin (5 mg kg^{-1}), b) carboplatin (64 mg kg^{-1}), c) carboplatin (100 mg kg^{-1}), and d) oxaliplatin (5 mg kg^{-1}). Below, HE staining images obtained for parallel sagittal sections of the same kidneys analyzed showing cortical and medullar areas. Tissue ablation was performed from left to right starting on top

Figure 4. Pt distribution between cortical and medullar areas observed through LA-ICP-IDMS analysis of kidney slices from rats treated with cisplatin and oxaliplatin (both at $5 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ bw}$), and carboplatin (64 and $100 \text{ mg.kg}^{-1} \text{ bw}$)

Table 1. Relative abundances of natural Pt and the spike

Table 2. Amount of Pt and accumulation rate in the kidney observed for the three drugs after LA-ICP-MS analysis of kidney slices from rats treated with cisplatin, oxaliplatin and carboplatin. Results expressed as mg Pt/Kg dry sample and (mg Pt/Kg dry sample)/mg Pt administered

1
2
3
4
5
6
7
8
9
10
11
12
13
14
15
16
17
18
19
20
21
22
23
24
25
26
27
28
29
30
31
32
33
34
35
36
37
38
39
40
41
42
43
44
45
46
47
48
49
50
51
52
53
54
55
56
57
58
59
60

Table 1.

Abundances		
Isotope	natural Pt	¹⁹⁴ Pt
190	0.0141	0.01
192	0.7827	0.04
194	32.968	90.20
195	33.8321	6.70
196	25.2424	1.90
198	71.636	1.20

Table 2.

Administered drug	Dosage administered (mg/Kg)	Amount of Pt (mg/Kg)	Accumulation rate (mg/Kg)/mg Pt _{ad}
Cisplatin	5	28,55	8,78
Oxaliplatin	5	25,43	10,36
Carboplatin	64	50,81	1,51
Carboplatin	100	105,20	2,00

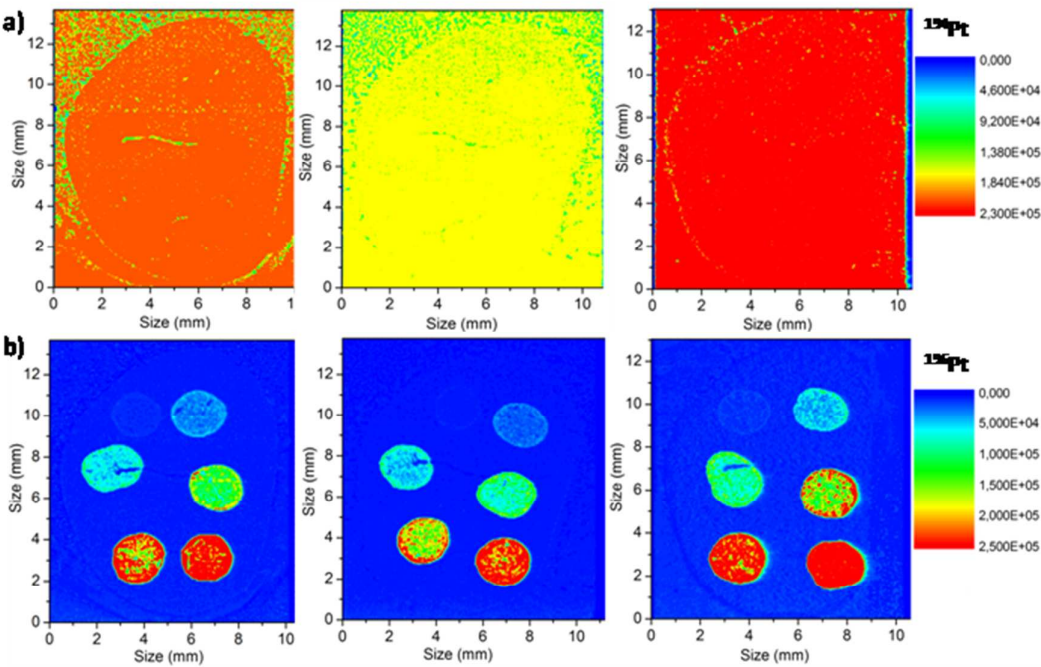


Figure 1.

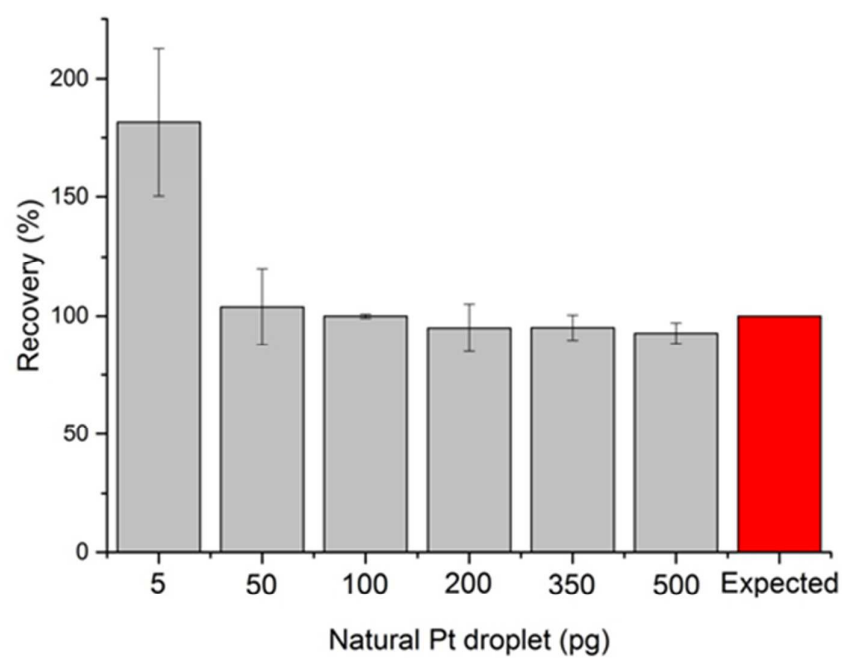


Figure 2.

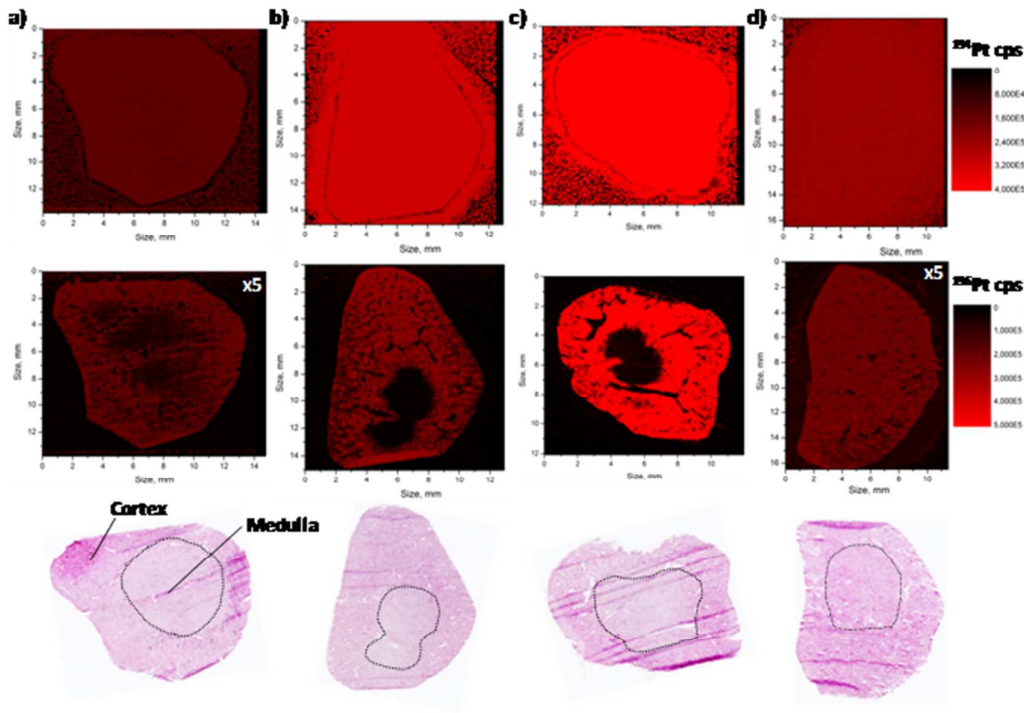


Figure 3.

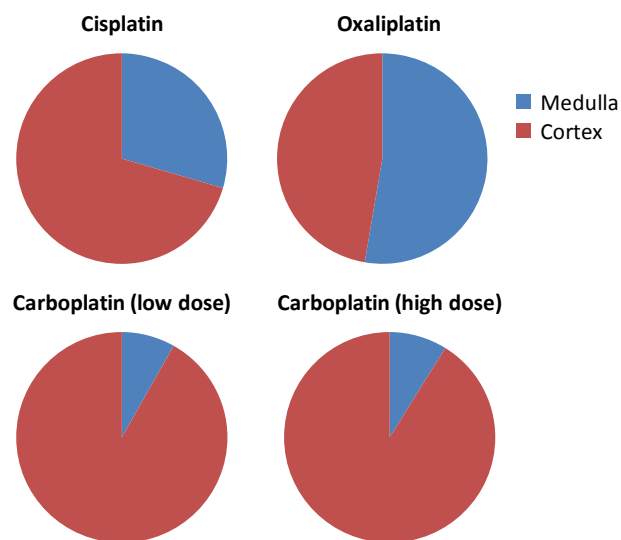
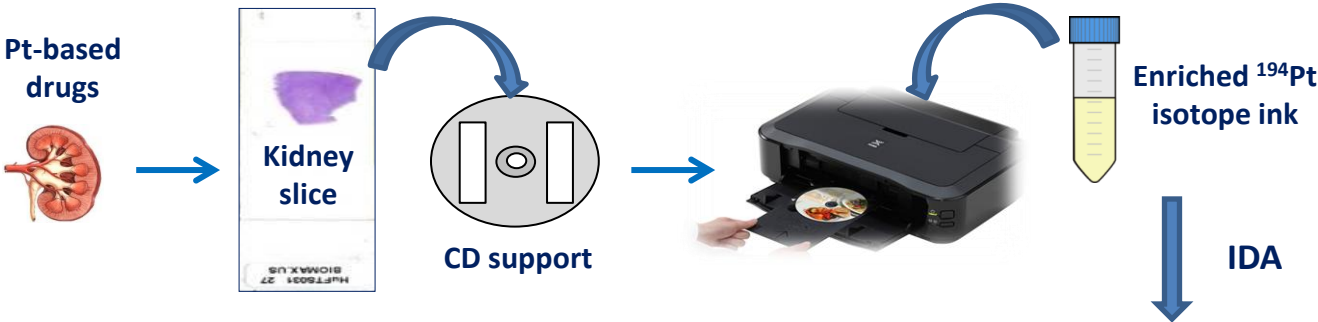
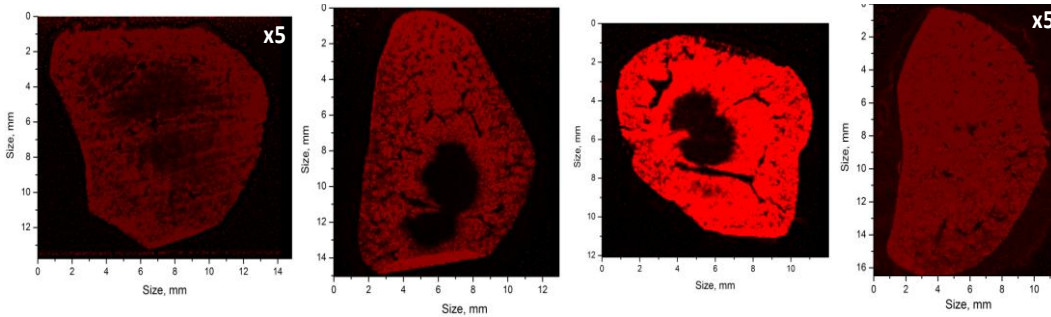


Figure 4.



LA-ICP-MS bioimages quantification



Discusión integradora



DISCUSIÓN INTEGRADORA

El trabajo de investigación desarrollado en esta memoria ha tenido como objetivo principal el desarrollo de estrategias bioanalíticas basadas en espectrometría de masas atómica y molecular y técnicas de separación electroforéticas multidimensionales para la determinación de proteínas ligadas a fármacos con base de Pt (cisplatino, carboplatino y oxaliplatino) en muestras renales, con el fin de aportar información sobre los mecanismos de la nefrotoxicidad inducida por cisplatino y contribuir al desarrollo de terapias mejoradas.

En esta sección se discuten globalmente los resultados obtenidos tras la realización de los diferentes trabajos que se incluyen en la presente Tesis Doctoral, divididos en dos apartados. El primero expone los avances conseguidos en el desarrollo de nuevas estrategias analíticas para la separación multidimensional de proteínas ligadas a Pt en muestras biológicas complejas, así como el desarrollo de metodologías basadas en espectrometría de masas molecular para la obtención de iones marcadores específicos de metales que faciliten la localización e identificación de proteínas ligadas a Pt en dichas muestras. Finalmente, el último apartado se centra en el desarrollo de una nueva metodología para la estandarización interna de la señal obtenida por LA-ICP-MS que permita obtener bioimágenes cualitativas comparables de la distribución de cisplatino, carboplatino y oxaliplatino en el riñón, así como para la obtención de bioimágenes bidimensionales cuantitativas.

Cabe destacar el carácter multidisciplinar de la labor investigadora llevada a cabo, conseguida gracias a la colaboración con diferentes grupos de investigación nacionales e internacionales. Además, otra característica importante del trabajo realizado es su final aplicación a muestras reales de riñones de rata impactados con los diferentes fármacos antitumorales de Pt, aunque en la mayoría de las ocasiones para la puesta a punto de las metodologías fuese necesario recurrir a sistemas más sencillos como proteínas modelo incubadas con dichos fármacos.

1. Desarrollo de estrategias bioanalíticas basadas en técnicas de separación multidimensionales y espectrometría de masas atómica y molecular para la determinación de proteínas ligadas a fármacos con base de Pt en muestras renales

En esta tesis se planteó el desarrollo de una metodología que permitiera la identificación de proteínas ligadas a Pt en muestras biológicas como son los riñones de ratas tratadas con fármacos antitumorales de Pt, superando los inconvenientes que presentan este tipo de muestras, como son su gran complejidad por el elevadísimo número de proteínas presentes en las mismas, y la baja abundancia de las proteínas ligadas a Pt objeto de potencial interés. La baja concentración de Pt en las muestras de tal complejidad requiere, además del empleo de técnicas de análisis con un alto grado de sensibilidad, el empleo de técnicas de separación que permitan realizar un fraccionamiento previo que simplifique dichas matrices y permita obtener muestras enriquecidas en las proteínas ligadas a Pt. Al mismo tiempo, el enlace relativamente lábil del Pt con las proteínas hace que se tengan que evaluar las condiciones bajo las que se desarrollan dichas metodologías, con el fin de mantener la integridad del enlace Pt-proteína a lo largo de todo el proceso.

1.1. Desarrollo de metodologías de separación multidimensional para el fraccionamiento de proteínas ligadas a Pt en muestras complejas

Una de las metodologías que presentan mayor resolución en la separación de proteínas es la electroforesis bidimensional (2D-PAGE). Las condiciones que se han

empleado tradicionalmente en este tipo de separaciones en la proteómica clásica incluyen el empleo de agentes desnaturalizantes y reductores como la tiourea y el DTT, que facilitan la separación mediante el desplegamiento de las proteínas y la reducción de los puentes disulfuro, respectivamente. Sin embargo, en el campo de la metalómica, no existe un método universal para la separación de proteínas ligadas a metales, y la débil unión entre éstos y las proteínas (que dependerá en gran medida del metal) debe ser tomada en cuenta. En general, trabajando en las condiciones tradicionales no se mantiene la integridad del enlace, por lo que diversos autores adoptaron como solución trabajar en condiciones “nativas” no reductoras, a pesar de que éstas proporcionan una resolución inferior.

En el **trabajo 1**, se determinaron las condiciones óptimas de separación mediante electroforesis SDS-PAGE y OFFGEL-IEF de una mezcla de proteínas modelo (HSA, TF, AC, MYO y CytC) incubadas con cisplatino que mantuvieran la integridad de los complejos Pt-proteína formados. En dicho trabajo se comprobó que las condiciones desnaturalizantes con urea 8M o 2% SDS en presencia de otros reactivos como Tris, glicerol, anfolitos o azul de bromofenol no producía pérdidas significativas del Pt ligado a proteínas. Sin embargo, se constató que la presencia de agentes con grupos tiol como el BME (5%), la tiourea (2.5 mM) y el DTT (64 mM) afectan negativamente a la recuperación de las proteínas ligadas a Pt tras el largo proceso de separación, debido a la alta afinidad que presenta el Pt por grupos dadores de electrones como el azufre. Por ello, es preferible que la separación de complejos Pt-proteína se realice en condiciones “suaves” (desnaturalizantes sin tiourea y no reductoras) que puedan mantener la integridad del enlace. Este hecho fue demostrado en el citado trabajo en la separación de fracciones citosólicas de riñón de ratas tratadas con cisplatino, donde se obtuvieron mayores recuperaciones del Pt ligado a proteínas en comparación con las condiciones tradicionales. Sin embargo, dichas condiciones no facilitan la solubilidad de las proteínas, dando lugar a separaciones con resoluciones muy bajas e incluso bajos rendimientos de digestión, sobre todo si las muestras son de gran complejidad.

Por todo lo comentado anteriormente, el **trabajo 2** de esta Tesis Doctoral se centró en evaluar la posibilidad de realizar separaciones de proteínas ligadas a Pt

mediante OFFGEL-IEF en condiciones reductoras. Para ello, y con el fin de mantener la integridad del enlace de los complejos Pt-proteínas, se empleó un agente reductor no tiólico como la tributilfosfina (TBP). Diversos autores han descrito ciertas ventajas en el empleo de este agente reductor con respecto al DTT, como una mejora en la solubilidad de las proteínas durante el proceso de separación por isoelectroenfoque, lo que da lugar a tiempos de separación inferiores y mayores resoluciones. Además, apuntan que al ser un compuesto no iónico (a diferencia del DTT) no migra hacia los electrodos durante el isoelectroenfoque, manteniendo las condiciones reductoras durante todo el proceso. Se realizaron separaciones de alta resolución mediante OFFGEL-IEF (24 pocillos, pH 3-10) en condiciones reductoras empleando TBP, que fueron aplicadas inicialmente a una mezcla de proteínas modelo (HSA, TF, MYO, AC y CytC) incubadas con cisplatino. Efectivamente, la ausencia de azufre en la molécula de TBP permitió preservar el enlace Pt-proteína durante la separación electroforética. Se obtuvieron recuperaciones de Pt en torno al 50% sobre el total de Pt teóricamente cargado, y superiores al 95% en el análisis de Pt que permanecía unido a proteínas en cada una de las 24 fracciones, lo cual fue determinado mediante ultrafiltración. Dichas recuperaciones fueron superiores a las obtenidas en separaciones realizadas en condiciones reductoras con DTT, donde se obtuvo una recuperación de sólo el 34% con respecto al total de Pt cargado.

Por otro lado, se realizó la separación de citosoles de riñón de ratas tratadas con cisplatino. Con el fin de simplificar la muestra y facilitar dicha separación, así como la posterior identificación de las proteínas platinadas se incluyó una dimensión previa de separación por SEC-ICP-MS, donde se eligió la fracción con la mayor relación Pt:proteína para los posteriores análisis. Al igual que en el caso de las proteínas modelo, la recuperación de Pt obtenida fue buena (52%). Curiosamente, este valor es muy cercano al rango de recuperación de proteína (65 ± 10)% indicado por el fabricante para diferentes mezclas de proteínas estándar utilizando el mismo tipo de tiras IPG. En este caso también fueron obtenidas recuperaciones en torno al 95% del Pt ligado a proteínas en cada una de las fracciones. Sin embargo, la separación de la misma fracción citosólica en condiciones reductoras con DTT dio lugar a una recuperación muy inferior, del 28 %, poniendo de manifiesto la idoneidad del TBP para

mantener la integridad de los complejos Pt-proteína en las separaciones electroforéticas.

En el **trabajo 3** se describe el protocolo a seguir para la separación de proteínas ligadas a metales mediante OFFGEL-IEF en condiciones reductoras en presencia de TBP. Además, se describió el protocolo para la separación electroforética mediante SDS-PAGE de proteínas ligadas a metales empleando en este caso como agente reductor otra fosfina libre de grupos tiol, la tricarboxietilfosfina (TCEP), la que también dio lugar a buenos resultados de recuperación del Pt ligado a proteínas.

Tras la experiencia obtenida, parece más apropiado afrontar la separación electroforética de proteínas ligadas a Pt mediante OFFGEL-IEF en vez de mediante SDS-PAGE. La separación mediante OFFGEL-IEF presenta una serie de ventajas sobre la separación por SDS-PAGE, como es principalmente la recuperación de las fracciones proteicas en fase líquida, que facilita las posteriores etapas de digestión de la muestra, ya que las digestiones en disolución parecen ser menos agresivas que las digestiones en gel. Además, la recuperación de las fracciones en estado líquido la hace más fácilmente combinable con las técnicas de espectrometría de masas moleculares. Por ello esta metodología se adoptó como primera dimensión de separación para la identificación de proteínas ligadas a Pt en muestras reales, seguida del análisis por nLC-ESI-MS/MS.

1.2. Desarrollo de un método para la digestión enzimática de proteínas ligadas a Pt

Tanto en los ensayos de proteómica como en metalómica, para abordar la identificación de proteínas es necesario realizar una digestión enzimática de las mismas, tras la cual los péptidos obtenidos serán finalmente analizados mediante nLC-ESI-MS/MS, ya que se ha demostrado que la separación por cromatografía líquida y la detección de péptidos por MS produce mejores resultados que si se realiza a nivel de proteínas. Al igual que en el caso de las técnicas de separación, las metodologías de digestión enzimática de proteínas empleadas habitualmente (digestiones en gel y en disolución) fueron desarrolladas en el campo de la proteómica clásica. Con objeto de mejorar el rendimiento de digestión, ambos tipos de digestión suelen realizarse en

condiciones desnaturalizantes y reductoras, lo que en metalómica supone el mismo riesgo de pérdida del metal unido a las proteínas comentado en el apartado anterior.

Recientemente, el grupo de Mattias Mann ha desarrollado un método de digestión enzimática de proteínas sobre filtros de corte molecular (FASP). En este método, las proteínas son retenidas y concentradas sobre un filtro de corte molecular comercial, el cual actuará como soporte para realizar la eliminación de detergentes, intercambio de buffers, reducción, alquilación y digestión triptica de las proteínas. Finalmente, los péptidos obtenidos son recogidos mediante ultrafiltración a través de la membrana. Cabe destacar que esta metodología proporciona eficiencias de digestión comparables con la tradicional digestión en disolución, y que ha sido empleada únicamente para estudios de proteómica clásica, no habiendo sido utilizada en el caso de la metaloproteómica. Siguiendo el mismo procedimiento, en el **trabajo 2** de esta Tesis Doctoral se optimizó el método de digestión FASP para la digestión de proteínas ligadas a Pt. Con el fin de evaluar la viabilidad del método, se realizó la digestión de muestras sencillas de albúmina incubada con cisplatino, obteniéndose resultados muy satisfactorios. Al igual que en los ensayos de separación electroforética, la TBP y el DTT fueron evaluados como posibles agentes reductores. En ambos casos se obtuvo una recuperación de proteínas en torno al 50%, que coincide con el rendimiento de digestión reportado por el grupo de Mattias Mann para ensayos de proteómica clásica. En la fracción peptídica, se obtuvo una recuperación de Pt del 40 y 39% para los ensayos con TBP y DTT, respectivamente. Con el fin de comprobar que dicha cantidad de Pt permanecía ligado a los péptidos tras el proceso de digestión se realizaron análisis mediante SEC-ICP-MS. Como puede observarse en la **Figura 23**, se encontró una gran banda de Pt entre los 12 y 23 minutos (95% aproximadamente del Pt total), correspondiendo con los tiempos de retención de los péptidos. Por otro lado, la cantidad de Pt encontrada en los tiempos de retención correspondientes al fármaco libre y sus derivados fue inferior al 5%. Este excelente resultado demuestra la viabilidad del proceso para mantener los complejos Pt-proteína. Se podría concluir que el hecho de que se mantenga la integridad de los enlaces Pt-proteína a lo largo de todo el proceso, incluso en los ensayos empleando DTT, podría ser debido al bajo tiempo de exposición que permanecen en contacto las proteínas con los diferentes reactivos, ya

que tras cada etapa del proceso previo a la digestión (lavados, desnaturalización, reducción y alquilación) los diferentes reactivos son eliminados mediante ultrafiltración. Para ambos agentes reductores (TBP y DTT) las pérdidas de Pt producidas tras las etapas de lavado, desnaturalización y reducción fueron inferiores al 15%.

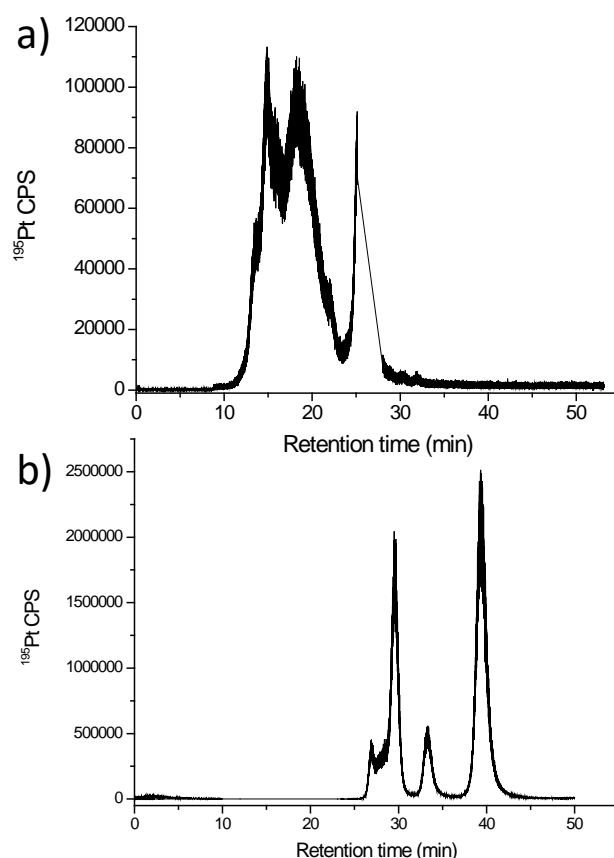


Figura 23. Cromatogramas SEC-ICP-MS monitorizando el isótopo ^{195}Pt para a) una mezcla de péptidos ligados a Pt obtenidos tras la digestión FASP de una muestra de HSA incubada con cisplatino; y b) una disolución 10 μM de cisplatino en NH_4HCO_3 50 mM.

Con objeto comparativo, se realizó la digestión FASP en condiciones no reductoras, obteniéndose una recuperación de Pt de tan sólo el 16%, lo que demuestra claramente la necesidad de emplear condiciones desnaturalizantes y reductoras en los procesos de digestión.

Con objeto de optimizar el rendimiento de digestión, en ensayos adicionales se realizaron dos etapas de digestión, añadiendo tripsina fresca a las proteínas que quedaban sin digerir en el filtro tras la primera etapa de digestión. Con esto, se consiguió incrementar en un 20% la recuperación de Pt ligado a biomoléculas.

En vista de los buenos resultados obtenidos, el método de digestión FASP fue aplicada a muestras más complejas (**trabajos 2, 3 y 4**) como mezclas de proteínas modelo incubadas con cisplatino, carboplatino y oxaliplatino, suero sanguíneo incubado con cisplatino y muestras de citosoles de riñón de ratas tratadas con cisplatino. En todos los casos los resultados obtenidos fueron muy satisfactorios, siendo siempre la cantidad obtenida de Pt ligado a péptidos superior al 95%.

Combinando los procedimientos de separación mediante OFFGEL-IEF y digestión mediante FASP descritos anteriormente, fue posible la identificación de diversas proteínas como potenciales dianas del cisplatino en el riñón (**trabajo 2**), que podrían aportar información de gran interés en los mecanismos de la nefrotoxicidad inducida por este fármaco. Además, tras la separación mediante OFFGEL-IEF en condiciones reductoras con TBP y la posterior digestión mediante FASP (tanto con TBP como con DTT) de las muestras de albúmina incubada con cisplatino, se encontraron tres péptidos platinados correspondientes a cuatro puntos de unión del fármaco a la proteína, entre los que se incluyen tres histidinas y una cisteína (debido a la afinidad del Pt por el azufre comentada anteriormente). Atendiendo a la estructura tridimensional de la proteína (empleando el modelo CPK), se comprobó que todos los sitios de unión encontrados eran residuos superficiales, por lo que son más accesibles al fármaco.

A la vista de los resultados obtenidos, podría concluirse que el grado de influencia de los reactivos sobre el enlace Pt-proteínas es muy dependiente de su concentración y del tiempo de exposición. Mientras que la baja concentración de DTT (5mM) y tiempo de exposición (una hora) empleados en el procedimiento de digestión FASP no dan lugar a pérdidas de Pt significativas con respecto al empleo del reductor TBP, sí se aprecian diferencias en el caso de la separación mediante OFFGEL-IEF, donde la concentración (64 mM) y el tiempo de exposición (30 horas aproximadamente) al

agente reductor es muy superior. Por otra parte, cabe destacar que el número de sitios de unión del cisplatino a la albúmina identificados empleando este procedimiento es muy superior al reportado por otros autores que emplearon la digestión tradicional en gel en condiciones reductoras con DTT (donde la concentración es de 10 mM y el tiempo de exposición 16h), donde solamente pudo identificarse el sitio de unión mayoritario del cisplatino a la HSA, el residuo Met298.

1.3. Desarrollo de una metodología “shotgun” para la identificación de complejos Pt-proteína

Con el fin de incrementar el número de proteínas ligadas a Pt identificadas en muestras biológicas, se abordó una aproximación “shotgun” que consistió en la digestión enzimática de las muestras proteicas mediante el método FASP seguido de una separación por isoelectroenfoque a nivel de péptidos (**trabajo 4**). La separación mediante OFFGEL-IEF a nivel de péptidos presenta una serie de ventajas con respecto a la separación a nivel de proteínas, como una mayor facilidad de manipulación de la muestra (debido a la mejor solubilidad de los péptidos en un mayor número de disolventes con respecto a las proteínas), así como la eliminación de las interacciones entre proteínas, y la posibilidad de analizar proteínas pequeñas e hidrofóbicas que habitualmente son problemáticas en las separaciones de proteínas por isoelectroenfoque. Además, algunos autores han descrito que un procedimiento “shotgun” basado en la separación de péptidos mediante OFFGEL-IEF seguido de su análisis por LC-MS/MS proporciona una identificación de proteínas muy superior a la obtenida por el método convencional de separación por PAGE y posterior digestión del gel. Por otro lado, se ha descrito que el rendimiento (en términos del número de proteínas identificadas) obtenido mediante este procedimiento es comparable al obtenido por el procedimiento “shotgun” tradicional conocido como MudPIT en el caso de muestras proteicas de complejidad media. Sin embargo, en el caso de muestras de alta complejidad proteica, algunos autores describen que el rendimiento obtenido tras la separación mediante OFFGEL-IEF es superior al obtenido mediante la primera dimensión de separación del MudPIT, que consiste en una separación cromatográfica de intercambio catiónico, debido a la mayor resolución que ofrece el

OFFGEL-IEF. Con respecto a la identificación de proteínas ligadas a metales y, en este caso, a los complejos Pt-proteína, al no ser necesarias las condiciones desnaturizantes y reductoras cuando se realizan las separaciones a nivel de péptidos se minimiza al máximo el riesgo de pérdidas de Pt, lo que supone una gran ventaja. Además, la realización de la digestión enzimática mediante el método FASP en la primera etapa del proceso permite la simplificación de la matriz y la preconcentración de la muestra previamente a su separación.

En el **trabajo 4** la metodología “*shotgun*” propuesta fue aplicada a muestras de menor a mayor complejidad, como HSA, mezclas de HSA, TF, MYO, AC y CytC, y suero sanguíneo incubados con cisplatino, carboplatino y oxaliplatino. Como se ha comentado en la sección anterior, la digestión mediante el método FASP proporcionó excelentes resultados para todas las muestras, por lo que podría establecerse como un buen punto de partida para la obtención de péptidos en los ensayos “*shotgun*”. Con respecto a la separación a nivel de péptidos mediante OFFGEL-IEF, en la separación de los digeridos de HSA incubada con los tres fármacos por separado se observaron perfiles de migración de los péptidos similares a lo largo de las 24 fracciones para los tres fármacos. Este hecho también se observó en las separaciones de los digeridos de las mezclas de las cinco proteínas modelo incubadas con los tres fármacos. Cabe destacar que la mayoría del Pt (determinado en cada una de las fracciones mediante ICP-MS) se encontró principalmente distribuida en las seis primeras fracciones (intervalo de pH: 3.48-4.79), lo que corresponde a la zona donde deben situarse teóricamente los péptidos trípticos según describen diferentes autores (a intervalos de pH entre 3.5 y 5).

Aplicando el procedimiento “*shotgun*”, las recuperaciones de Pt obtenidas fueron superiores a las comentadas anteriormente para la separación a nivel de proteínas, siendo de 50/56, 77/84 y 43/65 para las muestras de HSA/mezcla de proteínas incubadas con cisplatino, oxaliplatino y carboplatino, respectivamente. A diferencia de la sección D.1.1, la presencia de Pt libre en cada una de las fracciones fue determinada mediante SEC-ICP-MS, ya que el tamaño de los péptidos no permite realizarlo mediante ultrafiltración. Una vez más se comprobó que la presencia de

fármaco libre o sus derivados en las fracciones era inferior al 5%, hecho que pone de manifiesto, una vez más, la robustez de la metodología desarrollada.

En cuanto a los sitios de unión a las proteínas encontrados, cabe destacar que mediante el empleo de esta metodología se incrementó en gran medida el número de péptidos platinados identificados con respecto a los obtenidos en el trabajo 2, donde se realizaba un fraccionamiento de la muestra a nivel de proteínas. Fueron localizados un total de 17 péptidos platinados correspondientes a 7 puntos de unión del cisplatino a la albúmina, entre los que se incluyen diversas histidinas, y la metionina 298, el residuo más accesible de la proteína. Entre los péptidos encontrados, son de destacar los péptidos [$^5\text{SEVAHR}^{10} + \text{Pt}(\text{NH}_3)_2 + ^{13}\text{DLGEENFK}^{20}$] y [$^{65}\text{SLHTLFGDK}^{73} + \text{Pt}(\text{NH}_3)_2 + ^{241}\text{VHTEC}^*\text{C}^*\text{HGDLLC}^*\text{ADDR}^{257}$], donde el cisplatino se encuentra unido en forma de puente entre dos residuos, como puede observarse en las **Figuras 24 y 25**. Concretamente, el péptido [$^{65}\text{SLHTLFGDK}^{73} + \text{Pt}(\text{NH}_3)_2 + ^{241}\text{VHTEC}^*\text{C}^*\text{HGDLLC}^*\text{ADDR}^{257}$] presenta una gran relevancia biológica, ya que el cisplatino se encuentra entrecruzando los dominios I y II de la estructura tridimensional de la proteína mediante los residuos His67 e His247, ocupando el principal sitio de unión del Zn a esta proteína. Este hecho podría explicar las anomalías encontradas en los niveles de zinc reportados para los pacientes sometidos a tratamiento con cisplatino. Este sitio de unión del cisplatino a la albúmina fue postulado previamente por Hu *et al.* (**Figura 26**), aunque hasta ahora no se había demostrado dicha unión.

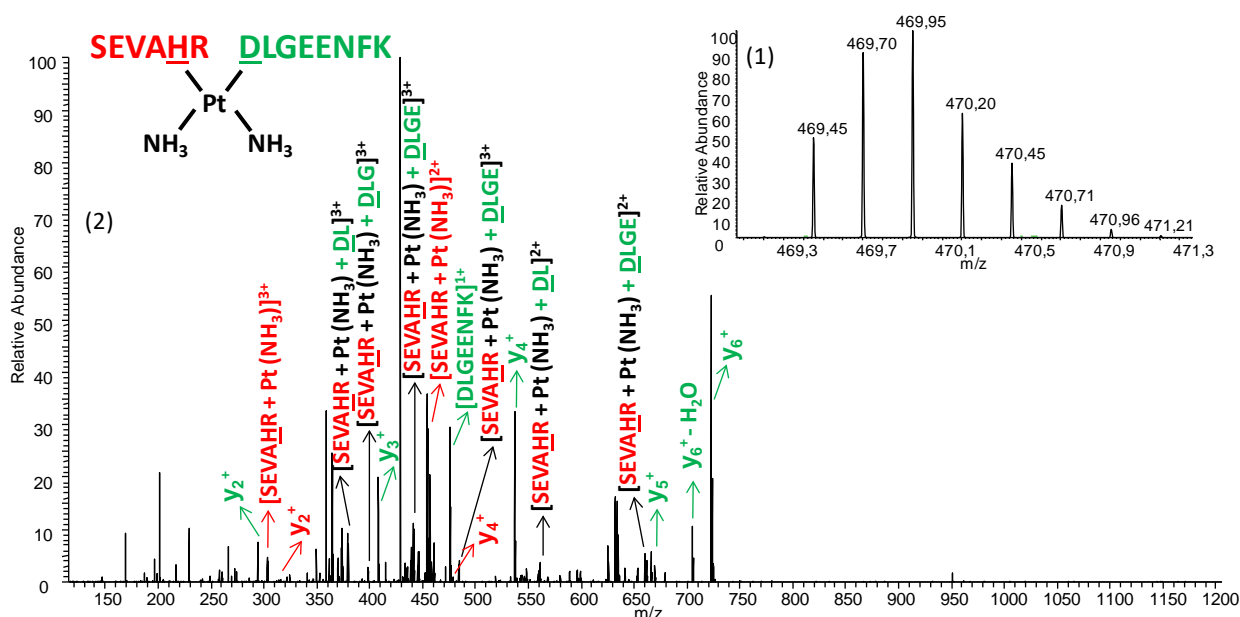


Figura 24. Espectro CID-MS/MS del ión encontrado a m/z 469.45 (4+) correspondiente al péptido platinado SEVAHR + $Pt(NH_3)_2$ + DLGEENFK, donde el cisplatino se encuentra uniendo en forma de puente los residuos H9 y D13

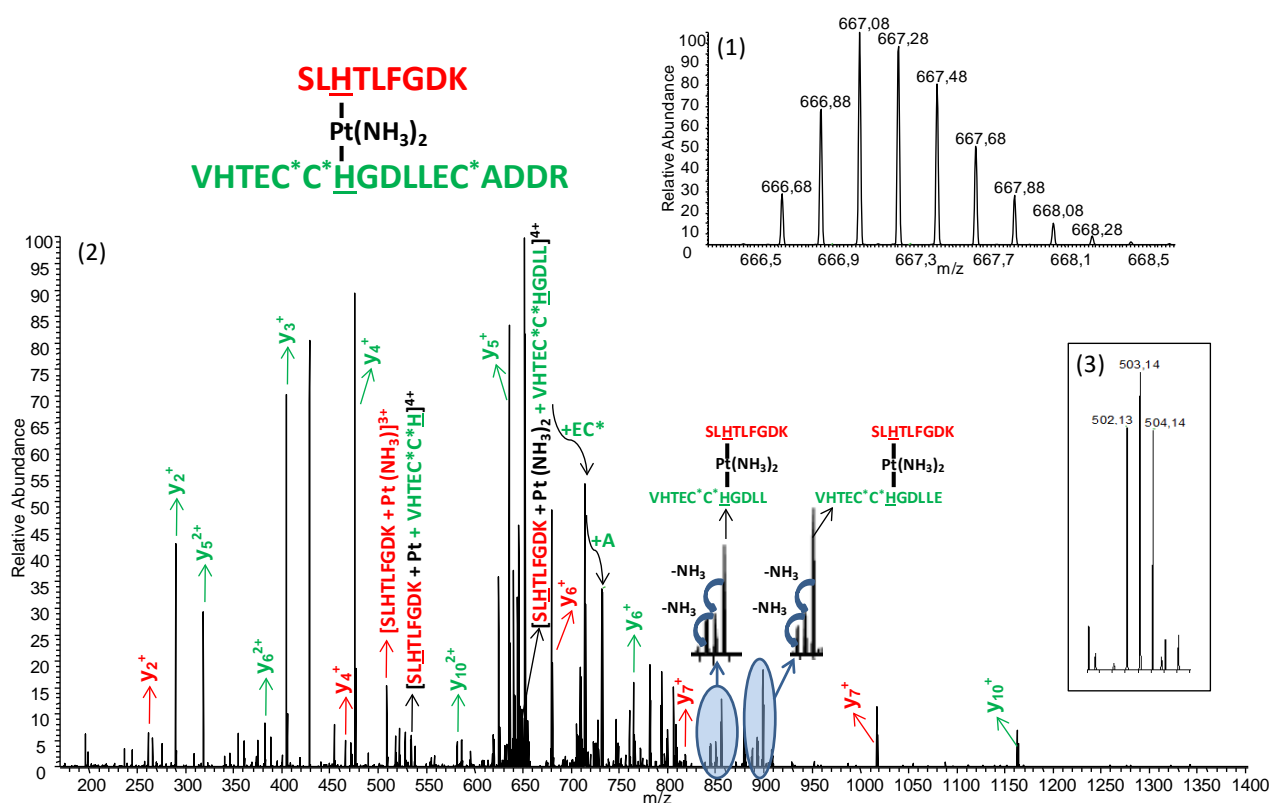


Figura 25. Espectro CID-MS/MS del ión encontrado a m/z 666.68 (5+) correspondiente al péptido platinado SLHTLFGDK + $Pt(NH_3)_2$ + VHTEC*C*HGDLLC*ADDR, donde el cisplatino se encuentra entrecruzando los dominios I y II de la estructura tridimensional de la HSA por coordinación a la His67 e His247

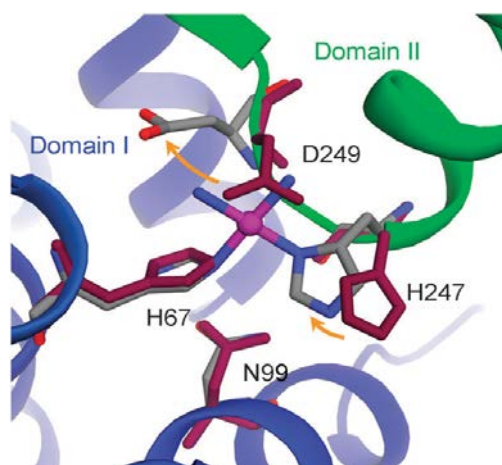


Figura 26. Modelo estructural de la unión de cisplatino a HSA en el cual se observa el entrecruzamiento de los dominios I y II por la unión de cisplatino a los residuos His67 e His247. Extraído de Hu et al. [204]

1.4. Desarrollo de una nueva metodología para la obtención de iones marcadores específicos de metales para la identificación de proteínas ligadas a Pt

267

Una vez desarrolladas y optimizadas las metodologías de fraccionamiento y digestión, los péptidos obtenidos fueron analizados mediante LC-ESI-MS/MS para la identificación de las proteínas modificadas con Pt. Puesto que un solo análisis genera miles de espectros de fragmentación de masas, en los estudios de proteómica clásica es habitual el empleo de motores de búsqueda como Sequest o MASCOT que hacen uso de bases de datos de secuencias para la identificación de las proteínas presentes en los espectros de masas obtenidos. Dichos programas emplean una serie de algoritmos basados en sistemas de puntuación estadística para clasificar cada espectro analizado en una muestra, de forma que, cuanto mayor sea la puntuación obtenida, mayor es la probabilidad de que la asignación espectro-péptido sea la correcta. Sin embargo, la experiencia obtenida a lo largo de esta Tesis Doctoral en la identificación automática mediante motores de búsqueda de complejos Pt-proteína es que ninguno de los péptidos con Pt identificados obtenían puntuaciones superiores al umbral de identificación. Este hecho puede ser debido a diferentes causas, como el reconocimiento defectuoso por parte de los motores de búsqueda del pico monoisotópico debido al complejo perfil isotópico que presentan los péptidos modificados con Pt respecto al péptido teórico; el complejo patrón de fragmentación

que presentan los péptidos platinados; la aparición en el espectro de fragmentación de posibles co-fragmentaciones de otras especies, ya que la ventana de masas empleada para la fragmentación de péptidos modificados con Pt es muy grande; y finalmente, la baja intensidad que presentan los iones platinados, debido a la baja abundancia de los péptidos platinados en las muestras o la menor eficiencia de ionización de los mismos. Por todo ello, todos los puntos de unión definidos en la presente Tesis Doctoral tuvieron que ser identificados mediante secuenciación manual de los espectros de masas correspondientes. Dicha tarea resulta muy larga y complicada, incluso en muestras de baja complejidad, ya que en un solo análisis se obtienen miles de espectros de masas, y supone un gran inconveniente en la identificación de proteínas ligadas a Pt en muestras biológicas, donde la concentración de péptidos modificados es muy baja.

Por ello, el **trabajo 5** se centró en el desarrollo de una metodología basada en la espectrometría de masas molecular que permitiera la obtención de iones marcadores específicos de metales, obteniendo información elemental y molecular en un mismo análisis, lo cual facilitaría la localización e identificación de especies modificadas con metales. Esta metodología se basó en la técnica de fragmentación por colisión a alta energía (HCD) para la obtención de fragmentos de masa muy pequeña, los cuales sean específicos del metal o heteroátomo presente en las especies de interés. Dicha metodología fue aplicada a diferentes biomoléculas ligadas a metales de interés en el campo de la metalómica, entre las que se encuentran proteínas ligadas a Pt.

Con respecto a la instrumentación utilizada, fueron estudiadas diversas combinaciones de fuentes de ionización y técnicas de fragmentación con el fin de obtener la combinación óptima para la producción de iones marcadores. Para ello, se estudió la eficiencia en la obtención de un ion marcador específico de Pt tras la fragmentación de una muestra sencilla de un péptido sintético incubado con cisplatino. En este punto, se observó que la ionización mediante ESI proporciona eficiencias mayores en la obtención del ion marcador respecto a la fuente MALDI. Empleando la ionización por ESI, fueron estudiados diferentes modos de fragmentación, observándose que la fragmentación mediante HCD proporciona mejores resultados que la fragmentación por IRMPD combinada con ECD. A su vez,

respecto al mismo tipo de fragmentación, se comprobó que la fragmentación por HCD realizada en un equipo del tipo ESI-LTQ-Orbitrap a una energía normalizada (NCE) de 400% (la máxima permitida por ese equipo) producía una eficiencia de obtención del ión marcador del doble comparada con la obtenida en un equipo del tipo Q-Exactive, donde el máximo de energía permitido es de un 200%.

La identidad de los iones marcadores obtenidos fue determinada por masa exacta estableciendo la mayor resolución permitida por el equipo, comprobándose que se obtenían dos tipos de iones marcadores específicos de Pt: $[Pt]^+$ y $[PtH]^+$. Se comprobó que la obtención de uno u otro dependía fundamentalmente de la carga del ión precursor, comprobándose que los iones de carga 3+ o superiores producían preferentemente el ion marcador $[Pt]^+$, mientras que los de carga 2+ o inferior producían el ion hidruro. Además, cabe destacar que la eficiencia de obtención del ion marcador es muy superior en la fragmentación de iones precursores de carga 3+ o superior, los cuales producían espectros de MS2 donde sólo se observa el ion marcador, mientras que la fragmentación de iones precursores de carga 2+ generaba numerosas especies modificadas con Pt.

La combinación de eventos de fragmentación mediante HCD con los tradicionales mediante CID (empleados en los métodos de masas habituales de la proteómica clásica) permitió la obtención de información elemental y estructural en un mismo análisis. Dicha metodología fue aplicada a una muestra más compleja, un suero sanguíneo incubado con cisplatino, donde se localizaron hasta 23 péptidos platinados. Entre ellos, se identificaron los puntos de unión localizados para la albúmina ya comentados anteriormente. Aunque para confirmar la identidad de los mismos sigue siendo necesario realizar una secuenciación manual, el hecho de que el ion marcador indique exactamente en qué punto del cromatograma se encuentran las especies platinadas supone un enorme avance dentro del campo de la metalómica.

En vista de los buenos resultados obtenidos y para ampliar el alcance de la metodología desarrollada, ésta fue aplicada a otras especies de interés en metalómica como los marcadores MeCAT y el yodo, empleados fundamentalmente para el marcaje de proteínas y anticuerpos. En la aplicación a un péptido marcado con marcadores

MeCAT de Ho y Lu, el ion marcador producido principalmente fue el óxido del lantánido correspondiente, $[\text{HoO}]^+$ y $[\text{LuO}]^+$, aunque también se obtuvieron las especies $[\text{HoH}_2\text{O}_2]^+$ y $[\text{LuH}_2\text{O}_2]^+$, pero en menor proporción. Cabe destacar el bajo LD obtenido mediante esta metodología, ya que se obtuvieron señales de ion marcador significativas tras la inyección de 200 attomoles. La fragmentación mediante HCD de un péptido sintético modificado con iodo proporcionó como ion marcador el propio ion I^+ . Sin embargo, la eficiencia de obtención del ion marcador para este elemento fue muy inferior respecto al Pt y los lantánidos, concluyéndose que la eficiencia de obtención del ion marcador es inversamente proporcional al potencial de ionización del elemento y a la fuerza del enlace a las proteínas. Este hecho podría explicar los resultados fallidos en el estudio de selenoproteínas. Por otra parte, se realizaron experimentos preliminares de MALDI-imagen donde se observaron distribuciones de metal similares en comparación con las obtenidas por ablación por láser (LA-ICP-MS), lo que abre un abanico de posibilidades en la aplicación de esta metodología en el campo de análisis de bioimágenes.

2. Desarrollo de metodologías analíticas para la obtención de bioimágenes cualitativas y cuantitativas de riñones impactados con fármacos de Pt

Como ha sido desarrollado a lo largo de esta memoria, la nefrotoxicidad asociada a los tratamientos con cisplatino es el efecto secundario más limitante y que restringe su empleo en los tratamientos contra el cáncer. Por ello, en los últimos años el estudio de posibles estrategias nefroprotectoras presenta un gran interés, para lo cual es necesaria la dilucidación de los mecanismos moleculares involucrados en la aparición de dicho efecto secundario. El carboplatino y el oxaliplatino son fármacos de segunda y tercera generación respectivamente, que fueron desarrollados con el fin de reducir los efectos secundarios producidos por el cisplatino. Con respecto a estos fármacos, se ha observado que el oxaliplatino no induce nefrotoxicidad a ninguna de las dosis empleadas en clínica, mientras que el carboplatino induce nefrotoxicidad pero en concentraciones muy elevadas. Por ello, el estudio de la distribución de los tres fármacos en las diferentes zonas del riñón puede ayudar al estudio de los

mecanismos de nefrotoxicidad, lo cual ha sido el último objetivo de la presente Tesis Doctoral, recogido en los **trabajos 6 y 7**.

La técnica por excelencia para el estudio de distribuciones elementales a nivel traza en muestras biológicas es la LA-ICP-MS. Sin embargo, en esta técnica existen numerosos factores que pueden provocar una variación de la señal obtenida a lo largo del tiempo de análisis. Por tanto, para poder obtener imágenes cualitativas comparables de la distribución de los tres fármacos en el riñón es necesario emplear una metodología de estandarización que permita normalizar las bioimágenes obtenidas en diferentes sesiones de medida y para diferentes tejidos. En la bibliografía se encuentran diversas metodologías aplicadas por diversos autores para este fin, como se describe en la sección de “Introducción”. Sin embargo, la metodología de estandarización interna desarrollada en el **trabajo 6** se presenta como una ingeniosa e interesante alternativa a las metodologías de estandarización descritas anteriormente, ya que permitió la obtención de bioimágenes normalizadas de forma fácil, rápida y económica. Dicha metodología consiste en el enriquecimiento de una tinta comercial con el patrón interno de interés (Ir en el caso del análisis de Pt) y la impresión directa de dicha disolución sobre la superficie de láminas de tejido mediante una impresora convencional. El análisis LA-ICP-MS de los tejidos impresos proporcionó bioimágenes cualitativas normalizadas, lo que permitió comparar la distribución de los fármacos antitumorales de Pt en el riñón. La metodología desarrollada fue aplicada a muestras de riñones de ratas tratadas con los tres fármacos mencionados a dosis en las que se comprobó mediante diferentes parámetros renales que existía daño renal (excepto en el caso del oxaliplatino, que como se ha comentado anteriormente, no presenta nefrotoxicidad). Los riñones fueron seccionados en láminas finas de 4 μm de grosor (para facilitar la completa ablación de la muestra y obtener unos resultados óptimos) y analizados mediante LA-ICP-MS.

Una vez optimizado el proceso de impresión en tejidos control, todos los tejidos fueron impresos con las condiciones optimizadas. Tras el análisis de los mismos por LA-ICP-MS y la creación de imágenes de código de colores representando la intensidad de señal del patrón interno para los diferentes tejidos, se comprobó que la deposición del patrón interno sobre la superficie de la muestra era totalmente uniforme, lo que es un

aspecto de vital importancia para la correcta normalización de las imágenes. Se observó que la propia matriz de los tejidos biológicos actúa como absorbente de la tinta, logrando así una homogeneidad completa en la deposición del patrón interno a lo largo del tejido.

La capacidad de la metodología desarrollada para la estandarización de imágenes fue evaluada mediante la deposición sobre una lámina de tejido control de dos gotas que contenían la misma cantidad de una disolución patrón de Pt y la posterior impresión del patrón interno sobre la superficie. Finalmente, tras un análisis mediante LA-ICP-MS en el que fueron modificados manualmente diversos parámetros instrumentales con el fin de simular las derivas instrumentales surgidas habitualmente en los análisis por LA-ICP-MS, se comprobó que en la imagen generada sin estandarización interna las dos gotas parecían tener concentraciones de Pt distintas (**Figura 27a**). Sin embargo, la imagen corregida mostró que ambas gotas presentaban una concentración de Pt muy similar (**Figura 27b**), poniendo de manifiesto el potencial de la técnica para la estandarización interna de las señales obtenidas tras los análisis por LA-ICP-MS.

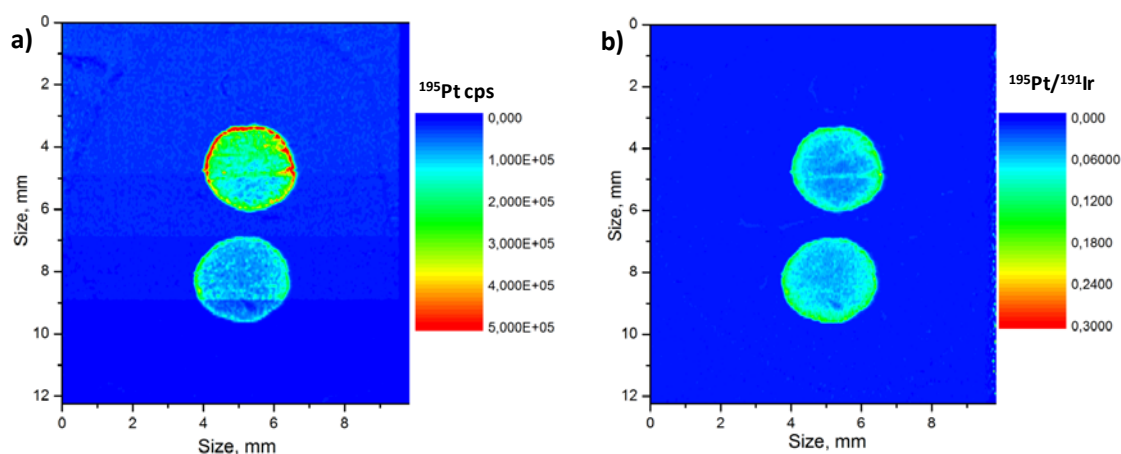


Figura 27. Evaluación de la compensación de derivas instrumentales mediante la metodología de estandarización interna desarrollada en el trabajo 5. a) Imagen obtenida monitorizando la señal de ^{195}Pt sin corregir. b) Imagen normalizada mediante la división de las señales obtenidas para el analito y el patrón interno ($^{195}\text{Pt}/^{191}\text{Ir}$).

Empleando la metodología desarrollada se consiguió obtener imágenes comparables de la distribución de cisplatino, carboplatino y oxaliplatino en el riñón. En este punto, se observó que el cisplatino se distribuye principalmente por la zona de la corteza renal, lo que concuerda con resultados previos obtenidos en el grupo de investigación. Igualmente, la distribución observada para el carboplatino fue muy similar a la del cisplatino. Significativamente, se observó que la distribución obtenida para el oxaliplatino era totalmente diferente a la de los otros fármacos, estando este fármaco distribuido de forma más o menos homogénea por las zonas cortical y medular. Este hecho puede estar directamente relacionado con la ausencia de nefrotoxicidad observada en los tratamientos con este fármaco. Se ha concluido que la menor concentración de oxaliplatino encontrada en la corteza puede ser debida al transporte de este fármaco como sustrato del transportador de la membrana apical MATE2-K, que lo transporta desde la corteza a la médula, por lo que estos transportadores podrían ser unas moléculas clave en los mecanismos involucrados en la nefrotoxicidad inducida por cisplatino.

En cuanto al reto que supone la cuantificación de bioimágenes mediante LA-ICP-MS, en el **trabajo 7** se evaluó la posibilidad de adaptar la metodología de estandarización desarrollada en el trabajo anterior para desarrollar una nueva metodología de cuantificación de imágenes obtenidas mediante LA-ICP-MS con análisis por dilución isotópica (LA-ICP-IDMS). La finalidad de dicho trabajo consistió en la cuantificación de cisplatino, carboplatino y oxaliplatino en láminas de riñones de ratas tratadas con los tres fármacos. En las últimas décadas, la técnica de dilución isotópica ha sido ampliamente desarrollada y empleada como una técnica de cuantificación absoluta dentro del área de la Química Analítica. En el campo de la bioimagen y en la técnica de LA-ICP-MS en concreto, la dilución isotópica ha sido empleada para la cuantificación de bioimágenes mediante la adición *online* pos-ablación. Sin embargo, este procedimiento presenta diversos inconvenientes, principalmente una disminución de la sensibilidad (debido a la dilución de la muestra) y problemas de fraccionamiento. Por tanto, en el **trabajo 7** se planteó el empleo de la dilución isotópica para el análisis cuantitativo de bioimágenes obtenidas mediante LA-ICP-MS aplicando el trazador isotópico según el modelo desarrollado en el trabajo 6 para la deposición del patrón

interno. Así, la tinta comercial fue enriquecida con el trazador de interés, en este caso un patrón enriquecido en ^{194}Pt , y depositada mediante impresión sobre la superficie de los tejidos. Al igual que en el trabajo 6, se observó una gran homogeneidad en la deposición del trazador sobre la superficie del tejido, lo cual es un punto crítico en todo método de análisis por dilución isotópica.

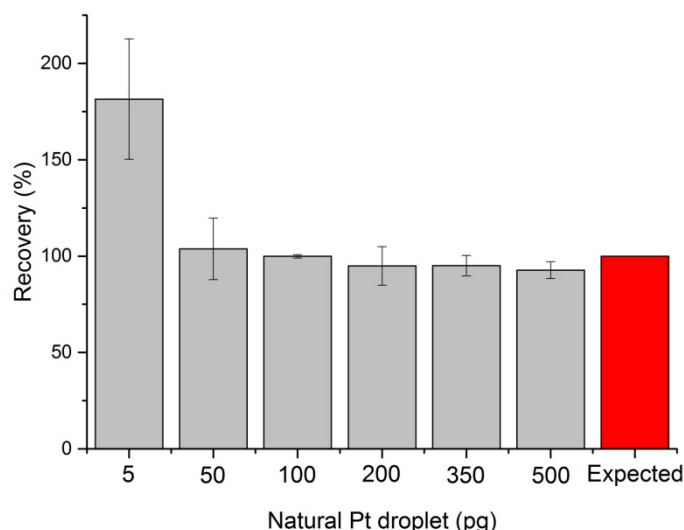


Figura 28. Comparación de los valores experimentales y teóricos obtenidos tras el análisis por LA-ICP-IDMS de un tejido renal control donde se depositaron gotas de concentración creciente de una disolución estándar de Pt natural

La validación de la metodología propuesta se consiguió por medio de la deposición de gotas de cantidades crecientes y conocidas de una disolución estándar de Pt natural sobre la superficie de tejidos control, seguido de la impresión de los mismos y de la integración de las bioimágenes obtenidas tras el análisis por LA-ICP-MS. Aplicando las ecuaciones de la dilución isotópica para los isótopos ^{194}Pt y ^{196}Pt , fue calculada la cantidad de Pt presente en cada una de las gotas y comparada con la cantidad teórica depositada. Como puede observarse en la **Figura 28**, las cantidades de Pt calculadas experimentalmente se aproximan mucho a los valores teóricos, siendo el error obtenido en la determinación de Pt inferior al 10% en casi todas las gotas. Cabe destacar que en la determinación de la cantidad de Pt en la gota de menor masa (5 pg)

se cometió un mayor error, como era de esperar, ya que la relación isotópica calculada se aproximaba mucho a la relación isotópica del trazador.

Mediante el empleo de la metodología desarrollada fueron cuantificados los tejidos de riñón impactados con cisplatino, carboplatino y oxaliplatino. En este punto, se obtuvo una concentración de cisplatino en el riñón de 28.55 mg kg^{-1} , la cual se asemeja a los resultados obtenidos previamente en el grupo de investigación mediante la digestión ácida de riñones procedentes del mismo tipo de tratamientos, lo que pone de manifiesto la fiabilidad de los resultados obtenidos. También, dividiendo la cantidad de Pt encontrada en los riñones analizados por la cantidad de Pt administrada en los diferentes tratamientos fue posible calcular la relación de acumulación. En este punto, se observó que a pesar de las mayores dosis de carboplatino administradas, su relación de acumulación en el riñón es muy inferior a la observada para cisplatino y oxaliplatino.

En cuanto a la distribución de los fármacos en las diferentes regiones renales, la cantidad de Pt presente en las zonas cortical y medular fue cuantificada en todos los riñones analizados mediante la metodología propuesta. En este punto, y de acuerdo con resultados previamente descritos por diferentes autores, se observó una mayor acumulación del cisplatino en la corteza, correspondiente a un 70% del total cuantificado en la sección de tejido. Igualmente, la distribución observada para el carboplatino presentaba una distribución similar, encontrándose sólo un 8% del fármaco en la médula. Sin embargo, el análisis de un riñón impactado con oxaliplatino, mostró que el fármaco se encontraba distribuido de forma más o menos homogénea entre ambas partes, de forma que un 53% del fármaco se encontraba localizado en la médula. Los resultados obtenidos indican la idoneidad de la metodología desarrollada para obtener información cuantitativa absoluta en diferentes secciones de tejidos, lo cual puede ser de gran importancia en otros tejidos como cortes cerebrales, donde poder cuantificar un determinado metal en las diferentes áreas del tejido puede ser de gran relevancia desde un punto de vista clínico.

Los excelentes resultados obtenidos ponen de manifiesto la utilidad de la metodología desarrollada para la estandarización y cuantificación de imágenes obtenidas mediante LA-ICP-MS. La gran ventaja que presenta esta metodología, además de su sencillez y bajo coste, reside en la posibilidad de aplicación a cualquier metal, debido a la posibilidad de enriquecer la tinta comercial con los patrones y trazadores adecuados en cada caso, y a cualquier tipo de muestra biológica, lo que abre un enorme abanico de posibilidades en el área de la Química Analítica.

Conclusiones



CONCLUSIONES

Las conclusiones más relevantes del trabajo recogido en esta tesis se resumen a continuación:

- Se ha demostrado que la separación electroforética de proteínas ligadas a Pt puede realizarse en condiciones reductoras empleando agentes reductores no tiólicos como la TBP o la TCEP, ya que permiten la conservación de los enlaces Pt-proteínas. Además, se ha confirmado el efecto negativo que presenta sobre la estabilidad de los enlaces Pt-proteína la tiourea y el DTT, que son el agente desnaturizante y reductor empleados tradicionalmente en este tipo de separaciones.
- La separación en condiciones reductoras (sin agentes tiólicos) mediante OFFGEL-IEF de fracciones enriquecidas en Pt mediante SEC-ICP-MS procedentes de fracciones citosólicas de riñón de ratas tratadas con cisplatino, permitió la identificación de numerosas proteínas renales como posibles dianas del cisplatino.
- La digestión enzimática de proteínas ligadas a Pt mediante el procedimiento FASP permite realizar la digestión en condiciones desnaturizantes y reductoras, incluso empleando agentes reductores tiólicos, conservando el

enlace Pt-proteína a lo largo de todo el proceso, lo cual la convierte en una gran alternativa a los métodos de digestión proteica empleados en la proteómica clásica.

- Se ha demostrado que la aproximación “*shotgun*” basada en la digestión de muestras proteicas incubadas con cisplatino, carboplatino y oxaliplatino mediante el método de digestión FASP, seguido de una separación a nivel de péptidos mediante OFFGEL-IEF mantiene la integridad de los enlaces Pt-proteína a lo largo de todo el proceso experimental, y mejora la posterior identificación de péptidos ligados a Pt dando lugar a la localización de un mayor número de puntos de unión del fármaco a la estructura de las proteínas con respecto a la separación a nivel de proteínas.
- Se ha demostrado la posibilidad de obtener información elemental y molecular en un mismo análisis empleando instrumentos de espectrometría de masas molecular, realizando la fragmentación de proteínas en celdas de colisión de alta energía, que permiten obtener iones marcadores de baja masa específicos de metales o heteroátomos. Este método abre un amplio abanico de posibilidades dentro del campo de la metaloproteómica para la detección de proteínas ligadas a metales o heteroátomos, las cuales suelen ser de gran interés pero poco abundantes en muestras biológicas.
- Se ha desarrollado una nueva metodología sencilla, rápida y de bajo coste para la estandarización interna de la señal obtenida tras el análisis mediante LA-ICP-MS de tejidos biológicos impresos, que permite la obtención de bioimágenes elementales normalizadas que pueden ser comparables entre diferentes tejidos o imágenes obtenidas en diferentes sesiones de medida.
- Se ha desarrollado una nueva metodología para la obtención de bioimágenes bidimensionales cuantitativas mediante LA-ICP-MS, imprimiendo sobre las

láminas de tejido un trazador que permite realizar una cuantificación exacta por dilución isotópica. El método fue validado mediante la deposición de gotas control con una cantidad conocida de Pt, habiéndose obtenido resultados muy satisfactorios, y siendo la primera vez que se aplica el análisis por dilución isotópica de este modo en análisis por LA-ICP-MS.

- La distribución renal que presenta el oxaliplatino (el cual se localiza de forma más o menos homogénea en las zonas cortical y medular), diferente a la que presentan el cisplatino y carboplatino (los cuales se distribuyen principalmente por la corteza renal) puede explicar la ausencia de nefrotoxicidad que existe en el tratamiento con oxaliplatino, y pone de manifiesto la importancia del estudio de la unión del cisplatino con las proteínas renales presentes en la corteza con el fin de dilucidar los mecanismos moleculares involucrados en la aparición de dicho efecto secundario.

Bibliografía



BIBLIOGRAFÍA

- [1] M. Peyrone, Ueber die Einwirkung des Ammoniaks auf Platinchlorür, Justus Liebigs Ann. Chem., 51 (1844) 1–29.
- [2] A. Werner, Beitrag zur Konstitution anorganischer Verbindungen, Zeitschrift Für Anorg. Chemie, 3 (1893) 267–330.
- [3] B. Rosenberg, L. Vancamp, T. Krigas, Inhibition of cell division in Escherichia Coli by electrolysis products from a platinum electrode, Nature, 205 (1965) 698.
- [4] B. Rosenberg, L. Vancamp, J. Trosko, V. Mansour, Platinum compounds - A new class of potent antitumour agents, Nature, 222 (1969) 385.
- [5] Approval Summary for cisplatin for Metastatic ovarian tumors, En FDA Oncol. Tools, Cent. Drug Eval. Res., 12 (1978).
- [6] N.J. Wheate, S. Walker, G.E. Craig, R. Oun, The status of platinum anticancer drugs in the clinic and in clinical trials, Dalt. Trans., 39 (2010) 8113.
- [7] S.C. Sweetman, Martindale: The complete drug reference, 37th ed., En Pharmaceutical Press London, 2009.
- [8] D. Lebwohl, R. Canetta, Clinical Oncology Update Clinical Development of Platinum Complexes in Cancer Therapy: an Historical Perspective and an Update, Eur J Cancer, 34 (1998) 1522–1534.
- [9] N. Kibrinsky, R. Sposto, N. Shah, Outcomes of Treatment of Children and Adolescents With Recurrent Non-Hodgkin's Lymphoma and Hodgkin's Disease With Dexamethasone, Etoposide, Cisplatin, Cytarabine, and L-Asparaginase, Maintenance Chemotherapy, and Transplantation: Children's Cancer Group , J. Clin. Oncol., (2001) 2390–2396.
- [10] B. Desoize, C. Madoulet, Particular aspects of platinum compounds used at present in cancer treatment, Crit. Rev. Oncol. Hematol., 42 (2002) 317–325.
- [11] C.A. Rabik, M.E. Dolan, Molecular mechanisms of resistance and toxicity associated with platinating agents, Cancer Treat. Rev., 33 (2007) 9–23.
- [12] V. Sahni, D. Choudhury, Z. Ahmed, Chemotherapy-associated renal dysfunction, Nat. Rev. Nephrol., 5 (2009) 450–462.
- [13] A. Casini, C. Hartinger, C. Gabbiani, E. Mini, P.J. Dyson, B.K. Keppler, L. Messori, Gold(III) compounds as anticancer agents: Relevance of gold–protein

- interactions for their mechanism of action, *J. Inorg. Biochem.*, 102 (2008) 564–575.
- [14] M.J. Clarke, Ruthenium metallopharmaceuticals, *Coord. Chem. Rev.*, 232 (2002) 69–93.
- [15] F. Pelletier, V. Comte, A. Massard, M. Wenzel, S. Toulot, P. Richard, M. Picquet, P. Le Gendre, O. Zava, F. EDAFE, A. Casini, P.J. Dyson, Development of bimetallic titanocene-ruthenium-arene complexes as anticancer agents: Relationships between structural and biological properties, *J. Med. Chem.*, 53 (2010) 6923–6933.
- [16] A.R. Timerbaev, Advances in developing tris(8-quinolinolato)gallium(III) as an anticancer drug: critical appraisal and prospects, *Metallomics*, 1 (2009) 193–8.
- [17] A. Levina, A. Mitra, P.A. Lay, Recent developments in ruthenium anticancer drugs, *Metallomics*, 1 (2009) 458.
- [18] M. Jakupec, B.K. Keppler, Gallium in cancer treatment, *Curr. Top. Med. Chem.*, 4 (2004) 1575–1583.
- [19] X. Zhang, X. Yan, Z. Zhou, F. Yang, Z. Wu, H. Sun, Arsenic Trioxide Controls the Fate of the PML-RAR a Oncoprotein by Directly Binding PML, *Science*, 328 (2010) 240–244.
- [20] M.J. Cleare, J.D. Hoeschele, Antitumour Platinum Compounds, *Cell*, (1973) 2–13.
- [21] C.X. Zhang, S.J. Lippard, New metal complexes as potential therapeutics, *Curr. Opin. Chem. Biol.*, 7 (2003) 481–489.
- [22] T. Boulikas, M. Vougiouka, Recent clinical trials using cisplatin, carboplatin and their combination chemotherapy drugs, *Oncol. Rep.*, 11 (2004) 559–595.
- [23] R.S. Herbst, G. Giaccone, J. Schiller, Gefitinib in Combination With Paclitaxel and Carboplatin in Advanced Non-Small-Cell Lung Cancer: A Phase III Trial—INTACT 2, *J. Clin. Oncol.*, 22 (2004) 785–794.
- [24] C.J. Langer, J.C. Leighton, C. McAleer, R. Comis, P.O'Dwyer, R. Ozols, Paclitaxel and carboplatin in the treatment of advanced non-small cell lung cancer, *J. Clin. Oncol.*, 13 (1995) 1860.
- [25] T. Boulikas, M. Vougiouka, Cisplatin and platinum drugs at the molecular level (Review), *Oncol. Rep.*, 10 (2003) 1663–1682.
- [26] A.M. Dygai, V. V Zhdanov, G.N. Zyuz'kov, E. V Udu, E. V Simanina, L.A. Gur'yantseva, T.Y. Khriukova, L.A. Stavrova, O.I. Epshtein, S.A. Sergeeva, E.D. Gol'dberg, Mechanisms of regulation of hemopoiesis during experimental cytostatic myelosuppression induced by carboplatin, *Bull. Exp. Biol. Med.*, 143 (2007) 581–4.
- [27] D.J. Stewart, Mechanisms of resistance to cisplatin and carboplatin, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 63 (2007) 12–31.
- [28] E. Raymond, S. Faivre, S. Chaney, J. Woynarowski, E. Cvitkovic, Cellular and Molecular Pharmacology of Oxaliplatin, *Mol. Cancer Ther.*, 1 (2002) 227–235.
- [29] M. Machover; DiazRubio, E; deGramont, A; Schilf, A; Gastiaburu, JJ; Brienza, S; Itzhaki, M; Metzger, G; NDaw, D; Vignoud, J, Two consecutive phase II studies of oxaliplatin (L-OHP) for treatment of patients with advanced colorectal carcinoma who were resistant to previous treatment with fluoropyrimidines, *Ann. Oncol.*, 7 (1996) 95–98.
- [30] J. Graham, M. Muhsin, P. Kirkpatrick, Oxaliplatin, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 3 (2004) 11–12.
- [31] A.A. Argyriou, P. Polychronopoulos, G. Iconomou, E. Chroni, H.P. Kalofonos, A review on oxaliplatin-induced peripheral nerve damage, *Cancer Treat. Rev.*, 34

- (2008) 368–377.
- [32] L.M. Pasetto, M.R. D'Andrea, E. Rossi, S. Monfardini, Oxaliplatin-related neurotoxicity: How and why?, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 59 (2006) 159–168.
 - [33] K. Hanada, M. Suda, N. Kanai, H. Ogata, Pharmacokinetics and toxicodynamics of oxaliplatin in rats: application of a toxicity factor to explain differences in the nephrotoxicity and myelosuppression induced by oxaliplatin and the other platinum antitumor derivatives, *Pharm. Res.*, 27 (2010) 1893–9.
 - [34] M. Shimada, H. Itamochi, J. Kigawa, Nedaplatin: A cisplatin derivative in cancer chemotherapy, *Cancer Manag. Res.*, 5 (2013) 67–76.
 - [35] T. Boulikas, A. Pantos, E. Bellis, P. Christofis, Designing platinum compounds in cancer : structures and mechanisms, 2007.
 - [36] M.E. Alberto, M.F.A. Lucas, M. Pavelka, N. Russo, The second-generation anticancer drug nedaplatin: A theoretical investigation on the hydrolysis mechanism, *J. Phys. Chem. B*, 113 (2009) 14473–14479.
 - [37] Y. Kawai, S. Taniuchi, S. Okahara, M. Nakamura, M. Gemba, Relationship between cisplatin or nedaplatin-induced nephrotoxicity and renal accumulation, *Biol. Pharm. Bull.*, 28 (2005) 1385–1388.
 - [38] T. Kodaira, N. Fuwa, H. Tachibana, S. Hidano, Phase I study of S-1 and nedaplatin for patients with recurrence of head and neck cancer, *Anticancer Res.*, 26 (2006) 2265–2268.
 - [39] A. Kuwahara, M. Yamamori, K. Nishiguchi, T. Okuno, N. Chayahara, I. Miki, T. Tamura, T. Inokuma, Y. Takemoto, T. Nakamura, K. Kataoka, T. Sakaeda, Replacement of cisplatin with nedaplatin in a definitive 5-fluorouracil/cisplatin-based chemoradiotherapy in Japanese patients with esophageal squamous cell carcinoma, *Int. J. Med. Sci.*, 6 (2009) 305–311.
 - [40] A.I. Limited, Lobaplatin: D 19466, *Drugs R. D.*, 4 (2003) 369–372.
 - [41] K. Mross, F. Meyberg, H. Fiebig, K. Hamm, D. Hieber, U; Aulenbacher, P; Hossfeld, Pharmacokinetic and Pharmacodynamic Study with Lobaplatin (D-19466), a New Platinum Complex, after Bolus Administration, *Onkologie*, 15 (1992) 139–146.
 - [42] J. Welink, E. Boven, J.B. Vermorken, H.E. Gall, W.J.F. Van Der Vijgh, Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Lobaplatin (D-19466) in Patients with Advanced Solid Tumors , Including Patients with Impaired Renal or Liver Function Pharmacokinetics and Pharmacodynamics of Lobaplatin (D-19466) in Patients with Advanced Sol, 5 (1999) 2349–2358.
 - [43] M.J. McKeage, Lobaplatin: a new antitumor platinum drug, *Expert Opin. Investig. Drugs*, 10 (2001) 119–128.
 - [44] D. Kim, H. Kim, Y. Cho, J. Tai, J. Ahn, T. Kim, K. Kim, Antitumor activity of cis-malonato[(4R,5R)-4,5-bis(aminomethyl)-2-isopropyl-1,3-dioxolane]platinum(II), a new platinum analogue, as an anticancer agent, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 35 (1995) 441–445.
 - [45] D. Kim, H. Kim, J. Tai, Y. Cho, T. Kim, K. Kim, J. Park, W. Hong, Pharmacokinetics and antitumor activity of a new platinum compound, cis-malonato[(4R,5R)-4,5-bis(aminomethyl)-2-isopropyl-1,3-dioxolane]platinum(II), as determined by ex vivo pharmacodynamics, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 37 (1995) 1–6.
 - [46] D. Kim, G. Kim, J. Gam, Y. Cho, H. Kim, J. Tai, K. Kim, W. Hong, J. Park, Synthesis and antitumor activity of a series of [2-substituted-4,5-bis(aminomethyl)-1,3-dioxolane]platinum(II) complexes, *J. Med. Chem.*, 37 (1994) 1471–1485.

- [47] J. Lee, J. Park, S. Lee, S. Kim, Y. Cho, H. Kuh, Anti-tumor activity of heptaplatin in combination with 5-fluorouracil or paclitaxel against human head and neck cancer cells in vitro, *Anticancer. Drugs*, 17 (2006) 377–384.
- [48] L. Kelland, An update on satraplatin: the first orally available platinum anticancer drug, *Expert Opin. Investig. Drugs*, 9 (2000) 1373–1382.
- [49] G. Samimi, S.B. Howell, Modulation of the cellular pharmacology of JM118, the major metabolite of satraplatin, by copper influx and efflux transporters, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 57 (2006) 781–788.
- [50] H. Choy, C. Park, M. Yao, Current status and future prospects for satraplatin, an oral platinum analogue, *Clin. Cancer Res.*, 14 (2008) 1633–1638.
- [51] P. Beale, I. Judson, a O'Donnell, J. Trigo, C. Rees, F. Raynaud, a Turner, L. Simmons, L. Etterley, A Phase I clinical and pharmacological study of cis-diamminedichloro(2-methylpyridine) platinum II (AMD473), *Br. J. Cancer*, 88 (2003) 1128–34.
- [52] J. Holford, S.Y. Sharp, B.A. Murrer, M. Abrams, L.R. Kelland, In vitro circumvention of cisplatin resistance by the novel sterically hindered platinum complex AMD473, *Brit. J. Cancer*, 77 (1998) 366–373.
- [53] Y. Chen, Z. Guo, S. Parsons, P.J. Sadler, Stereospecific and kinetic control over the hydrolysis of a sterically hindered platinum picoline anticancer complex, *Chem. - A Eur. J.*, 4 (1998) 672–676.
- [54] I. Raynaud, M. Goddard, Novel Sterically and Hindered Platinum Toxicology , Pharmacokinetics Platinum (II) Complex : in Mice ' In Vivo a Activity , *Clin. Cancer Res.*, 3 (1997) 2063–2074.
- [55] A.R. Battle, R. Choi, D.E. Hibbs, T.W. Hambley, Preparative , Structural , and Electrochemical Studies, *Inorg. Chem.*, 45 (2006) 6317–6322.
- [56] G.P. Stathopoulos, T. Boulikas, Lipoplatin formulation review article, *J. Drug Deliv.*, 2012 (2012) 581363.
- [57] M. Koukourakis, A. Giatromanolaki, M. Pitiakoudis, G. Kouklakis, P. Tsoutsou, I. Abatzoglou, M. Panteliadou, K. Sismanidou, E. Sivridis, T. Boulikas, Concurrent Liposomal Cisplatin (Lipoplatin), 5-Fluorouracil and Radiotherapy for the Treatment of Locally Advanced Gastric Cancer: A Phase I/II Study, *Int. J. Radiat. Oncol.*, 78 (2010) 150–155.
- [58] J.J. Yu, X. Yang, Q. Song, M.D. Mueller, S.C. Remick, Dicycloplatin, a Novel Platinum Analog in Chemotherapy: Synthesis of Chinese Pre-clinical and Clinical Profile and Emerging Mechanistic Studies, *Anticancer Res.*, 34 (2014) 455–463.
- [59] K.-J. Liu, Z.-Z. Guan, Y. Liang, X.-Q. Yang, J. Peng, H. Huang, Q.-X. Shao, M.-Z. Wang, Y.-Z. Zhu, C.-P. Wu, S.-B. Wang, J.-P. Xiong, Y.-X. Bai, S.-Y. Yu, Y. Zhang, X.-H. Hu, J.-F. Feng, S.-X. Wu, S.-C. Jiao, C.-C. Zhou, et al., A double-blind, randomized phase II study of dicycloplatin plus paclitaxel versus carboplatin plus paclitaxel as first-line therapy for patients with advanced non-small-cell lung cancers, *Arch. Med. Sci.*, 4 (2014) 717–724.
- [60] A. Kozubík, V. Horváth, L. Šviháľková-Šindlerová, K. Souček, J. Hofmanová, P. Sova, A. Kroutil, F. Žák, A. Mistr, J. Turánek, High effectiveness of platinum(IV) complex with adamantylamine in overcoming resistance to cisplatin and suppressing proliferation of ovarian cancer cells in vitro, *Biochem. Pharmacol.*, 69 (2005) 373–383.
- [61] S. Moghaddam, C. Yang, M. Rekharsky, Y.H. Ko, K. Kim, Y. Inoue, M.K. Gilson, New Ultrahigh Affinity Host - Guest Complexes of Cucurbit [7] uril with Bicyclo [2 2 2] octane and Adamantane Guests : Thermodynamic

- Analysis and Evaluation of M2 Affinity Calculations, (2011) 3570–3581.
- [62] R.N. Bose, L. Maurmann, R.J. Mishur, L. Yasui, S. Gupta, W.S. Grayburn, H. Hofstetter, T. Salley, Non-DNA-binding platinum anticancer agents: Cytotoxic activities of platinum-phosphato complexes towards human ovarian cancer cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 105 (2008) 18314–18319.
- [63] S. Moghaddas, P. Majmudar, R. Marin, H. Dezvareh, C. Qi, E. Soans, R.N. Bose, Phosphaplatins, next generation platinum antitumor agents: A paradigm shift in designing and defining molecular targets, *Inorganica Chim. Acta*, 393 (2012) 173–181.
- [64] T.C. Johnstone, G.Y. Park, S.J. Lippard, Understanding and improving platinum anticancer drugs - Phenanthriplatin, *Anticancer Res.*, 34 (2014) 471–476.
- [65] P. Reece, I. Stafford, R. Abbott, C. Anderson, J. Denham, S. Freeman, R. Morris, P. Gill, C. Olweny, 2- versus 24-hour infusion of cisplatin: pharmacokinetic considerations, *J. Clin. Oncol.*, 7 (1989) 270–275.
- [66] C. Myers, J. Collins, Pharmacology of Intraperitoneal Chemotherapy, *Cancer Invest.*, 1 (1983) 395–407.
- [67] S. Berners-Price, T. Frenkiel, U. Frey, J. Ranfordcand, P. Sadler, Hydrolysis Products of Cisplatin: pK, Determinations via [1H, 15N] NMR Spectros, *J. Chem. Soc. Chem. Commun.*, 10 (1992) 789–791.
- [68] J. Kozelka, Molecular origin of the sequence-dependent kinetics of reactions between cisplatin derivatives and DNA, *Inorganica Chim. Acta*, 362 (2009) 651–668.
- [69] S.E. Miller, D.A. House, The Hydrolysis Products of cis-Dichlorodiammineplatinum(II) 2 The Kinetics of Formation of the cis-Diamminedi(aqua)platinum(II) Cation, *Inorganica Chim. Acta*, 166 (1989) 189–191.
- [70] J. Reedijk, Why does Cisplatin reach Guanine-n7 with competing s-donor ligands available in the cell?, *Chem. Rev.*, 99 (1999) 2499–510.
- [71] J. Reedijk, New clues for platinum antitumor chemistry: kinetically controlled metal binding to DNA, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 100 (2003) 3611–6.
- [72] T. Falta, G. Koellensperger, A. Standler, W. Buchberger, R.M. Mader, S. Hann, Quantification of cisplatin, carboplatin and oxaliplatin in spiked human plasma samples by ICP-SFMS and hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) combined with ICP-MS detection, *J. Anal. At. Spectrom.*, 24 (2009) 1336.
- [73] J. Szpunar, A. Makarov, T. Pieper, B.K. Keppler, R. Lobinski, Investigation of metallodrug-protein interactions by size-exclusion chromatography coupled with inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS), *Anal. Chim. Acta*, 387 (1999) 135–144.
- [74] K. Wang, J. Lu, R. Li, The events that occur when cisplatin encounters cells, *Coord. Chem. Rev.*, 151 (1996) 53–88.
- [75] K. Himmelstein, T. Patton, R. Belt, S. Taylor, A. Repta, L. Sternson, Clinical kinetics of intact cisplatin and some related species, *Clin. Pharmacol. Ther.*, 29 (1981) 658–664.
- [76] C. Møller, H.S. Tastesen, B. Gammelgaard, I.H. Lambert, S. Stürup, Stability, accumulation and cytotoxicity of an albumin-cisplatin adduct, *Metallomics*, 2 (2010) 811–8.
- [77] F. Yu, J. Megyesi, P.M. Price, Cytoplasmic initiation of cisplatin cytotoxicity, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 295 (2008) F44–F52.
- [78] R.R. Barefoot, Speciation of platinum compounds: A review of recent

- applications in studies of platinum anticancer drugs, *J. Chromatogr. B Biomed. Sci. Appl.*, 751 (2001) 205–211.
- [79] P. Tothill, H.S. Klys, L.M. Matheson, K. McKay, J.F. Smyth, The long-term retention of platinum in human tissues following the administration of cisplatin or carboplatin for cancer chemotherapy, *Eur. J. Cancer*, 28 (1992) 1358–1361.
- [80] L. Lagasse, R. Pretorius, E. Petrilli, L. Ford, J. Hoeschele, C. Kean, The metabolism of cis-dichlorodiammineplatinum (II): distribution, clearance, and toxicity, *Am. J. Obstet. Gynecol.*, 139 (1981) 791–796.
- [81] B. Schnurr, H. Heinrich, R. Gust, Investigations on the decomposition of carboplatin in infusion solutions II Effect of 1,1-cyclobutanedicarboxylic acid admixture, *Mikrochim. Acta*, 140 (2002) 141–148.
- [82] S. Hann, Z. Stefanka, K. Lenz, G. Stingeder, Novel separation method for highly sensitive speciation of cancerostatic platinum compounds by HPLC – ICP – MS, *Anal. Bioanal. Chem.*, 381 (2005) 405–412.
- [83] K. Vivekanandan, M.G. Swamy, S. Prasad, G.C. Maikap, R. Mukherjee, A.C. Burman, Identification of degradation products from aqueous carboplatin injection samples by electrospray mass spectrometry, 313 (2006) 214–221.
- [84] Y. Sasaki, T. Amano, M. Morita, T. Shinkai, K. Eguchi, T. Tamura, Y. Ohe, A. Kojima, N. Saijo, Phase I study and pharmacological analysis of cis-diammine(glycolato)platinum (254-S; NSC 375101D) administered by 5-day continuous intravenous infusion, *Cancer Res.*, 51 (1991) 1472–1477.
- [85] G. Natarajan, R. Malathi, E. Holler, Increased DNA-binding activity of cis-1,1-cyclobutanedicarboxylatodiammineplatinum(II) (carboplatin) in the presence of nucleophiles and human breast cancer MCF-7 cell cytoplasmic extracts: activation theory revisited, *Biochem. Pharmacol.*, 58 (1999) 1625–9.
- [86] R. Go, A. Adjei, Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin, *J. Clin. Oncol.*, 17 (1999) 409–422.
- [87] T. Taguchi, S. Tsukagoshi, H. Furue, H. Niitani, K. Noda, Phase I clinical study of oxaliplatin, *Gan To Kagaku Ryoho*, 25 (1998) 1899–1907.
- [88] Debiopharm, Oxaliplatin: investigator's brochure, Lausanne: Debiopharm, (1998).
- [89] M.A. Graham, G.F. Lockwood, D. Greenslade, S. Brienza, M. Bayssas, E. Gamelin, Clinical pharmacokinetics of oxaliplatin: A critical review, *Clin. Cancer Res.*, 6 (2000) 1205–1218.
- [90] P. Allain, O. Heudi, A. Cailleux, A. Le Bouil, F. Larra, M. Boisdron-Celle, E. Gamelin, Early biotransformations of oxaliplatin after its intravenous administration to cancer patients, *Drug Metab. Dispos.*, 28 (2000) 1379–1384.
- [91] D. Esteban-Fernández, E. Moreno-Gordaliza, B. Cañas, M.A. Palacios, M.M. Gómez-Gómez, Analytical methodologies for metallomics studies of antitumor Pt-containing drugs, *Metallomics*, 2 (2010) 19–38.
- [92] J. Peng, R. Mandal, M. Sawyer, X.F. Li, Characterization of intact hemoglobin and oxaliplatin interaction by nanoelectrospray ionization tandem mass spectrometry, *Clin. Chem.*, 51 (2005) 2274–2281.
- [93] L. Pendyala, P.J. Creaven, B. Oxaliplatin, In Vitro Cytotoxicity , Protein Binding , Red Blood Cell Partitioning , and Biotransformation of Oxaliplatin In Vitro Cytotoxicity , Protein Binding , Red Blood Cell Partitioning , and, (1993) 5970–5976.
- [94] F. Lévi, G. Metzger, C. Massari, G. Milano, Oxaliplatin: pharmacokinetics and chronopharmacological aspects, *Clin. Pharmacokinet.*, 38 (2000) 1–21.
- [95] F. Levi, J.L. Misset, S. Brienza, R. Adam, G. Metzger, M. Itzakhi, J.P.

- Caussanel, F. Kunstlinger, S. Lecouturier, A. Descorps-Declere, F. Lévi, a Descorps-Declère, A chronopharmacologic phase II clinical trial with 5-fluorouracil, folinic acid, and oxaliplatin using an ambulatory multichannel programmable pump High antitumor effectiveness against metastatic colorectal cancer, *Cancer*, 69 (1992) 893–900.
- [96] H. Yanagimoto, S. Satoi, M. Sho, T. Akahori, Phase I study assessing the feasibility of the triple combination chemotherapy of SOXIRI (S-1/ oxaliplatin / irinotecan) in patients with unresectable pancreatic ductal adenocarcinoma, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 77 (2016) 35–41.
- [97] Y.W. Yi, I. Bae, Effects of solvents on in vitro potencies of platinum compounds, *DNA Repair (Amst)*, 10 (2011) 1084–5.
- [98] N.J. Wheate, Improving platinum(II)-based anticancer drug delivery using cucurbit[n]urils, *J. Inorg. Biochem.*, 102 (2008) 2060–2066.
- [99] J.A. Plumb, B. Venugopal, R. Oun, N. Gomez-Roman, Y. Kawazoe, N.S. Venkataramanan, N.J. Wheate, Cucurbit[7]uril encapsulated cisplatin overcomes cisplatin resistance via a pharmacokinetic effect, *Metallomics*, 4 (2012) 561–7.
- [100] Y.J. Jeon, S.-Y. Kim, Y.H. Ko, S. Sakamoto, K. Yamaguchi, K. Kim, Novel molecular drug carrier: encapsulation of oxaliplatin in cucurbit[7]uril and its effects on stability and reactivity of the drug, *Org. Biomol. Chem.*, 3 (2005) 2122–2125.
- [101] V. Torchilin, Tumor delivery of macromolecular drugs based on the EPR effect, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 63 (2011) 131–135.
- [102] H. Maeda, The enhanced permeability and retention (EPR) effect in tumor vasculature: The key role of tumor-selective macromolecular drug targeting, *Adv. Enzyme Regul.*, 41 (2001) 189–207.
- [103] A.K. Iyer, G. Khaled, J. Fang, H. Maeda, Exploiting the enhanced permeability and retention effect for tumor targeting, *Drug Discov. Today*, 11 (2006) 812–818.
- [104] A. Technologies, *Cancer Nanotechnology Podcast*, (2010) 60761.
- [105] J. Fang, H. Nakamura, H. Maeda, The EPR effect: Unique features of tumor blood vessels for drug delivery, factors involved, and limitations and augmentation of the effect, *Adv. Drug Deliv. Rev.*, 63 (2011) 136–151.
- [106] M.J.A. De Jonge, M. Slingerland, W.J. Loos, E.A.C. Wiemer, H. Burger, R.H.J. Mathijssen, J.R. Kroep, M.A.G. Den Hollander, D. Van Der Biessen, M.H. Lam, J. Verweij, H. Gelderblom, Early cessation of the clinical development of LiPlaCis, a liposomal cisplatin formulation, *Eur. J. Cancer*, 46 (2010) 3016–3021.
- [107] O. Rolland, C.-O. Turrin, A.-M. Caminade, J.-P. Majoral, Dendrimers and nanomedicine: multivalency in action, *New J. Chem.*, 33 (2009) 1809.
- [108] G.J. Kirkpatrick, J.A. Plumb, O.B. Sutcliffe, D.J. Flint, N.J. Wheate, Evaluation of anionic half generation 35-65 poly(amidoamine) dendrimers as delivery vehicles for the active component of the anticancer drug cisplatin, *J. Inorg. Biochem.*, 105 (2011) 1115–1122.
- [109] T. Kapp, A. Dullin, R. Gust, Platinum(II)-dendrimer conjugates: Synthesis and investigations on cytotoxicity, cellular distribution, platinum release, DNA, and protein binding, *Bioconjug. Chem.*, 21 (2010) 328–337.
- [110] S. Sánchez-Paradinas, M. Pérez-Andrés, M.J. Almendral-Parra, E. Rodríguez-Fernández, Á. Millán, F. Palacio, A. Orfao, J.J. Criado, M. Fuentes, Enhanced cytotoxic activity of bile acid cisplatin derivatives by conjugation with gold nanoparticles, *J. Inorg. Biochem.*, 131 (2014) 8–11.
- [111] G.E. Craig, S.D. Brown, D.A. Lamprou, D. Graham, N.J. Wheate, Cisplatin-

- tethered gold nanoparticles that exhibit enhanced reproducibility, drug loading, and stability: A step closer to pharmaceutical approval?, *Inorg. Chem.*, 51 (2012) 3490–3497.
- [112] Z. Mahdaviifar, R. Moridzadeh, Theoretical prediction of encapsulation and adsorption of platinum-anticancer drugs into single walled boron nitride and carbon nanotubes, *J. Incl. Phenom. Macrocycl. Chem.*, 79 (2014) 443–457.
- [113] S. Suri, H. Fenniri, B. Singh, Nanotechnology-based drug delivery systems, *J. Occup. Med. Toxicol.*, 2 (2007) 16.
- [114] H. Huang, E. Pierstorff, E. Osawa, D. Ho, Active nanodiamond hydrogels for chemotherapeutic delivery, *Nano Lett.*, 7 (2007) 3305–3314.
- [115] Z.H. Siddik, Cisplatin: mode of cytotoxic action and molecular basis of resistance, *Oncogene*, 22 (2003) 7265–79.
- [116] S.P. Binks, M. Dobrota, Kinetics and mechanism of uptake of platinum-based pharmaceuticals by the rat small intestine, *Biochem. Pharmacol.*, 40 (1990) 1329–1336.
- [117] A. Yonezawa, K.I. Inui, Organic cation transporter OCT/SLC22A and H⁺/organic cation antiporter MATE/SLC47A are key molecules for nephrotoxicity of platinum agents, *Biochem. Pharmacol.*, 81 (2011) 563–568.
- [118] P.D. Dobson, D.B. Kell, Carrier-mediated cellular uptake of pharmaceutical drugs: an exception or the rule?, *Nat. Rev. Drug Discov.*, 7 (2008) 205–220.
- [119] H. Burger, W.J. Loos, K. Eechoute, J. Verweij, R.H.J. Mathijssen, E.A.C. Wiemer, Drug transporters of platinum-based anticancer agents and their clinical significance, *Drug Resist. Updat.*, 14 (2011) 22–34.
- [120] M.A. Hediger, M.F. Romero, J. Bin Peng, A. Rolfs, H. Takanaga, E.A. Bruford, The ABCs of solute carriers: Physiological, pathological and therapeutic implications of human membrane transport proteins, *Pflugers Arch. Eur. J. Physiol.*, 447 (2004) 465–468.
- [121] Y.M. Kuo, B. Zhou, D. Cosco, J. Gitschier, The copper transporter CTR1 provides an essential function in mammalian embryonic development, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 98 (2001) 6836–41.
- [122] X. Wang, X. Du, H. Li, D.S.B. Chan, H. Sun, The effect of the extracellular domain of human copper transporter (hCTR1) on cisplatin activation, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 50 (2011) 2706–2711.
- [123] C.A. Larson, P.L. Adams, B.G. Blair, R. Safaei, S.B. Howell, The Role of the Methionines and Histidines in the Transmembrane Domain of Mammalian Copper Transporter 1 in the Cellular Accumulation of Cisplatin, *Mol. Pharmacol.*, 78 (2010) 333–339.
- [124] R. Safaei, S.B. Howell, Copper transporters regulate the cellular pharmacology and sensitivity to Pt drugs, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 53 (2005) 13–23.
- [125] C.A. Larson, B.G. Blair, R. Safaei, S.B. Howell, The Role of the Mammalian Copper Transporter 1 in the Cellular Accumulation of Platinum-Based Drugs, *Mol. Pharmacol.*, 75 (2009) 324–330.
- [126] A.K. Holzer, G.H. Manorek, S.B. Howell, Contribution of the major copper influx transporter CTR1 to the cellular accumulation of cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin, *Mol. Pharmacol.*, 70 (2006) 1390–1394.
- [127] X. Lin, T. Okuda, A. Holzer, S.B. Howell, The copper transporter CTR1 regulates cisplatin uptake in *Saccharomyces cerevisiae*, *Mol. Pharmacol.*, 62 (2002) 1154–1159.
- [128] S. Ishida, J. Lee, D.J. Thiele, I. Herskowitz, Uptake of the anticancer drug cisplatin mediated by the copper transporter Ctr1 in yeast and mammals, *Proc.*

- Natl. Acad. Sci. U. S. A., 99 (2002) 14298–14302.
- [129] J. Bertinato, E. Swist, L.J. Plouffe, S.P.J. Brooks, M.R. L'abbé, Ctr2 is partially localized to the plasma membrane and stimulates copper uptake in COS-7 cells, *Biochem. J.*, 409 (2008) 731–740.
 - [130] B.G. Blair, C. Larson, R. Safaei, S.B. Howell, Copper transporter 2 regulates the cellular accumulation and cytotoxicity of cisplatin and carboplatin, *Clin. Cancer Res.*, 15 (2009) 4312–4321.
 - [131] H. Koepsell, K. Lips, C. Volk, Polyspecific organic cation transporters: Structure, function, physiological roles, and biopharmaceutical implications, *Pharm. Res.*, 24 (2007) 1227–1251.
 - [132] B.F. Pan, D.H. Sweet, J.B. Pritchard, R. Chen, J.A. Nelson, A transfected cell model for the renal toxin transporter, rOCT2, *Toxicol. Sci.*, 47 (1999) 181–186.
 - [133] T. Endo, O. Kimura, M. Sakata, Carrier-mediated uptake of cisplatin by the OK renal epithelial cell line, *Toxicology*, 146 (2000) 187–195.
 - [134] H. Burger, A. Zoumaro-Djayoon, A. W.M. Boersma, J. Helleman, E.M.J.J. Berns, R.H.J. Mathijssen, W.J. Loos, E.A.C. Wiemer, Differential transport of platinum compounds by the human organic cation transporter hOCT2 (hSLC22A2), *Br. J. Pharmacol.*, 159 (2010) 898–908.
 - [135] J.A. Sprowl, G. Ciarimboli, C.S. Lancaster, H. Giovinozzo, A.A. Gibson, G. Du, L.J. Janke, G. Cavaletti, A.F. Shields, A. Sparreboom, Oxaliplatin-induced neurotoxicity is dependent on the organic cation transporter OCT2, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 110 (2013) 11199–204.
 - [136] S. Zhang, K.S. Lovejoy, J.E. Shima, L.L. Lagpacan, Y. Shu, A. Lapuk, Y. Chen, T. Komori, J.W. Gray, X. Chen, S.J. Lippard, K.M. Giacomini, Organic cation transporters are determinants of oxaliplatin cytotoxicity, *Cancer Res.*, 66 (2006) 8847–8857.
 - [137] H. Motohashi, K. Inui, Organic cation transporter OCTs (SLC22) and MATEs (SLC47) in the human kidney, *AAPS J.*, 15 (2013) 581–8.
 - [138] S. Lutsenko, N.L. Barnes, M.Y. Bartee, O.Y. Dmitriev, Function and regulation of human copper-transporting ATPases, *Physiol. Rev.*, 87 (2007) 1011–1046.
 - [139] G. Samimi, R. Safaei, K. Katano, A.K. Holzer, M. Rochdi, M. Tomioka, M. Goodman, S.B. Howell, Increased expression of the copper efflux transporter ATP7A mediates resistance to cisplatin, carboplatin, and oxaliplatin in ovarian cancer cells, *Clin. Cancer Res.*, 10 (2004) 4661–4669.
 - [140] R. Safaei, S. Otani, B.J. Larson, M.L. Rasmussen, S.B. Howell, Transport of cisplatin by the copper efflux transporter ATP7B, *Mol. Pharmacol.*, 73 (2008) 461–468.
 - [141] M. Komatsu, T. Sumizawa, M. Mutoh, Z.S. Chen, K. Terada, T. Furukawa, X.L. Yang, H. Gao, N. Miura, T. Sugiyama, S.I. Akiyama, Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) is associated with cisplatin resistance, *Cancer Res.*, 60 (2000) 1312–1316.
 - [142] K. Katano, A. Kondo, R. Safaei, A. Holzer, G. Samimi, M. Mishima, Y.M. Kuo, M. Rochdi, S.B. Howell, Acquisition of resistance to cisplatin is accompanied by changes in the cellular pharmacology of copper, *Cancer Res.*, 62 (2002) 6559–6565.
 - [143] A. Yonezawa, K.I. Inui, Importance of the multidrug and toxin extrusion MATE/SLC47A family to pharmacokinetics, pharmacodynamics/toxicodynamics and pharmacogenomics, *Br. J. Pharmacol.*, 164 (2011) 1817–1825.
 - [144] T. Terada, K.I. Inui, Physiological and pharmacokinetic roles of H⁺/organic cation antiporters (MATE/SLC47A), *Biochem. Pharmacol.*, 75 (2008) 1689–

- 1696.
- [145] S. Masuda, T. Terada, A. Yonezawa, Y. Tanihara, K. Kishimoto, T. Katsura, O. Ogawa, K. Inui, Identification and Functional Characterization of a New Human Kidney-Specific H⁺/Organic Cation Antiporter, Kidney-Specific Multidrug and Toxin Extrusion 2, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 17 (2006) 2127–2135.
- [146] M. Otsuka, T. Matsumoto, R. Morimoto, S. Arioka, H. Omote, Y. Moriyama, A human transporter protein that mediates the final excretion step for toxic organic cations, *Proc Natl Acad Sci USA*, 102 (2005) 17923–17928.
- [147] A. Yonezawa, S. Masuda, S. Yokoo, T. Katsura, K.-I. Inui, Cisplatin and oxaliplatin, but not carboplatin and nedaplatin, are substrates for human organic cation transporters (SLC22A1-3 and multidrug and toxin extrusion family), *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 319 (2006) 879–886.
- [148] S. Yokoo, A. Yonezawa, S. Masuda, A. Fukatsu, T. Katsura, K.I. Inui, Differential contribution of organic cation transporters, OCT2 and MATE1, in platinum agent-induced nephrotoxicity, *Biochem. Pharmacol.*, 74 (2007) 477–487.
- [149] E. Jamieson, S. Lippard, Structure , Recognition , and Processing of Cisplatin – DNA Adducts, *Chem. Rev.*, 99 (1999) 2467–2498.
- [150] S. Dasari, P. Bernard Tchounwou, Cisplatin in cancer therapy: Molecular mechanisms of action, *Eur. J. Pharmacol.*, 740 (2014) 364–378.
- [151] O. Pinato, C. Musetti, N.P. Farrell, C. Sissi, Platinum-based drugs and proteins: Reactivity and relevance to DNA adduct formation, *J. Inorg. Biochem.*, 122 (2013) 27–37.
- [152] L. Kelland, The resurgence of platinum-based cancer chemotherapy, *Nat. Rev. Cancer*, 7 (2007) 573–584.
- [153] A.M. Pizarro, P.J. Sadler, Unusual DNA binding modes for metal anticancer complexes, *Biochimie*, 91 (2009) 1198–1211.
- [154] R.J. Knox, F. Friedlos, D.A. Lydall, J.J. Roberts, Mechanism of cytotoxicity of anticancer platinum drugs: evidence that cis-diamminedichloroplatinum(II) and cis-diammine-(1,1-cyclobutanedicarboxylato)platinum(II) differ only in the kinetics of their interaction with DNA, *Cancer Res*, 46 (1986) 1972–1979.
- [155] A.M. Fichtinger-Schepman, S.D. van der Velde-Visser, H.C. van Dijk-Knijnenburg, A.T. van Oosterom, R.A. Baan, F. Berends, Kinetics of the formation and removal of cisplatin-DNA adducts in blood cells and tumor tissue of cancer patients receiving chemotherapy: comparison with in vitro adduct formation, *Cancer Res.*, 50 (1990) 7887–7894.
- [156] P. M. Takahara, A. C. Rosenzweig, C. A. Frederick, S. J. Lippard, Crystal structure of double-stranded DNA containing the major adduct of the anticancer drug cisplatin, *Nature*, 377 (1995) 649–652.
- [157] R.C. Todd, S.J. Lippard, Inhibition of transcription by platinum antitumor compounds, *Metallomics*, 1 (2009) 280–291.
- [158] Y. Jung, S.J. Lippard, Direct cellular responses to platinum-induced DNA damage, *Chem. Rev.*, 107 (2007) 1387–1407.
- [159] Z. Suo, S.J. Lippard, K.A. Johnson, Single d(GpG)/cis-diammineplatinum(II) adduct-induced inhibition of DNA polymerization, *Biochemistry*, 38 (1999) 715–726.
- [160] J.L. Misset, Oxaliplatin in practice, *Br. J. Cancer*, 77 Suppl 4 (1998) 4–7.
- [161] E. Cvitkovic, Ongoing and unsaid on oxaliplatin: the hope, *Br. J. Cancer*, 77 Suppl 4 (1998) 8–11.
- [162] M. Kartalou, J.M. Essigmann, Recognition of cisplatin adducts by cellular

- proteins, *Mutat. Res. - Fundam. Mol. Mech. Mutagen.*, 478 (2001) 1–21.
- [163] A. Eastman, Activation of programmed cell death by anticancer agents: cisplatin as a model system, *Cancer Cells*, 2 (1990) 275–280.
 - [164] K. Woźniak, J. Błasiak, Recognition and repair of DNA-cisplatin adducts, *Acta Biochim. Pol.*, 49 (2002) 583–596.
 - [165] K. V. Ferry, T.C. Hamilton, S.W. Johnson, Increased nucleotide excision repair in cisplatin-resistant ovarian cancer cells: role of ERCC1-XPF, *Biochem. Pharmacol.*, 60 (2000) 1305–1313.
 - [166] M. Dabholkar, J. Vionnet, F. Bostick-Bruton, J.J. Yu, E. Reed, Messenger RNA levels of XPAC and ERCC1 in ovarian cancer tissue correlate with response to platinum-based chemotherapy, *J. Clin. Invest.*, 94 (1994) 703–708.
 - [167] J.G. Moggs, D.E. Szymkowski, M. Yamada, P. Karran, R.D. Wood, Differential human nucleotide excision repair of paired and mispaired cisplatin-DNA adducts, *Nucleic Acids Res.*, 25 (1997) 480–490.
 - [168] D.B. Zamble, D. Mu, J.T. Reardon, A. Sancar, S.J. Lippard, Repair of cisplatin-DNA adducts by the mammalian excision nuclease, *Biochemistry*, 35 (1996) 10004–10013.
 - [169] J.C. Huang, D.B. Zamble, J.T. Reardon, S.J. Lippard, a Sancar, HMG-domain proteins specifically inhibit the repair of the major DNA adduct of the anticancer drug cisplatin by human excision nuclease, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 91 (1994) 10394–10398.
 - [170] G. Chipitsyna, D. Slonina, K. Siddiqui, F. Peruzzi, T. Skorski, K. Reiss, B.E. Sawaya, K. Khalili, S. Amini, HIV-1 Tat increases cell survival in response to cisplatin by stimulating Rad51 gene expression, *Oncogene*, 23 (2004) 2664–71.
 - [171] L. Stojic, R. Brun, J. Jiricny, Mismatch repair and DNA damage signalling, *DNA Repair (Amst.)*, 3 (2004) 1091–1101.
 - [172] G. Francia, S.K. Green, G. Bocci, S. Man, U. Emmenegger, J.M.L. Ebos, A. Weinerman, Y. Shaked, R.S. Kerbel, Down-regulation of DNA mismatch repair proteins in human and murine tumor spheroids: implications for multicellular resistance to alkylating agents, *Mol. Cancer Ther.*, 4 (2005) 1484–94.
 - [173] J. Olasz, L. Mandoky, L. Géczi, I. Bodrogi, O. Csuka, M. Bak, Influence of hMLH1 methylation, mismatch repair deficiency and microsatellite instability on chemoresistance of testicular germ-cell tumors, *Anticancer Res.*, 25 (2005) 4319–4324.
 - [174] X. Lin, S.B. Howell, DNA mismatch repair and p53 function are major determinants of the rate of development of cisplatin resistance, *Mol. Cancer Ther.*, 5 (2006) 1239–47.
 - [175] J.E. Clodfelter, M.B. Gentry, K. Drotschmann, MSH2 missense mutations alter cisplatin cytotoxicity and promote cisplatin-induced genome instability, *Nucleic Acids Res.*, 33 (2005) 3323–3330.
 - [176] G. Strathdee, M.J. MacKean, M. Illand, R. Brown, A role for methylation of the hMLH1 promoter in loss of hMLH1 expression and drug resistance in ovarian cancer, *Oncogene*, 18 (1999) 2335–41.
 - [177] S.G. Chaney, S.L. Campbell, E. Bassett, Y. Wu, Recognition and processing of cisplatin- and oxaliplatin-DNA adducts, *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, 53 (2005) 3–11.
 - [178] J.M. Havener, S.A.N. McElhinny, E. Bassett, M. Gauger, D.A. Ramsden, S.G. Chaney, Translesion Synthesis Past Platinum DNA Adducts by Human DNA Polymerase μ , *Biochemistry*, 42 (2003) 1777–1788.
 - [179] J. Hoffmann, M. Pillaire, G. Magat, V. Podustt, U. Hobschert, G. Villani, DNA

- polymerase (3 bypasses in vitro a single d (GpG) -cisplatin adduct placed on codon 13 of the HRAS gene, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 92 (1995) 5356–5360.
- [180] C. Masutani, R. Kusumoto, S. Iwai, F. Hanaoka, Mechanisms of accurate translesion synthesis by human DNA polymerase h, *EMBO J.*, 19 (2000).
- [181] A. Vaisman, S.G. Chaney, The Efficiency and Fidelity of Translesion Synthesis past Cisplatin and Oxaliplatin GpG Adducts by Human DNA Polymerase β , *J. Biol. Chem.*, 275 (2000) 13017–13025.
- [182] A. Vaisman, C. Masutani, F. Hanaoka, S.G. Chaney, Efficient Translesion Replication Past Oxaliplatin and Cisplatin GpG Adducts by, *Biochemistry*, 39 (2000) 4575–4580.
- [183] Y. Canitrot, C. Cazaux, M. Fréchet, K. Bouayadi, C. Lesca, B. Salles, J.-S. Hoffmann, Overexpression of DNA polymerase beta in cell results in a mutator phenotype and a decreased sensitivity to anticancer drugs, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 95 (1998) 12586–12590.
- [184] M.R. Albertella, C.M. Green, A.R. Lehmann, M.J.O. Connor, A Role for Polymerase H in the Cellular Tolerance to Cisplatin-Induced Damage, (2005) 9799–9807.
- [185] M. Frankenberg-schwager, D. Kirchermeier, G. Greif, K. Baer, M. Becker, D. Frankenberg, Cisplatin-mediated DNA double-strand breaks in replicating but not in quiescent cells of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, 212 (2005) 175–184.
- [186] R.G. Sargent, J.L. Meservy, B.D. Perkins, A.E. Kilburn, Z. Intody, G.M. Adair, R.S. Nairn, J.H. Wilson, Role of the nucleotide excision repair gene ERCC1 in formation of recombination-dependent rearrangements in mammalian cells, 28 (2000) 3771–3778.
- [187] G.M. Adair, R.L. Rolig, D. Moore-faver, M. Zabelshansky, J.H. Wilson, R.S. Nairn, Role of ERCC1 in removal of long non-homologous tails during targeted homologous recombination, 19 (2000).
- [188] V. Beljanski, L.G. Marzilli, P.W. Doetsch, DNA Damage-Processing Pathways Involved in the Eukaryotic Cellular Response to Anticancer DNA Cross-Linking Drugs, 65 (2004) 1496–1506.
- [189] D. Esteban-Fernández, M. Montes-Bayón, E. Blanco González, M.M. Gómez Gómez, M.A. Palacios, A. Sanz-Medel, Atomic (HPLC-ICP-MS) and molecular mass spectrometry (ESI-Q-TOF) to study cis-platin interactions with serum proteins, *J. Anal. At. Spectrom.*, 23 (2008) 378.
- [190] A.R. Timerbaev, C.G. Hartinger, S.S. Aleksenko, B.K. Keppler, Interactions of antitumor metallodrugs with serum proteins: Advances in characterization using modern analytical methodology, *Chem. Rev.*, 106 (2006) 2224–2248.
- [191] C. Brauckmann, C.A. Wehe, M. Kieshauer, C. Lanvers-Kaminsky, M. Sperling, U. Karst, The interaction of platinum-based drugs with native biologically relevant proteins, *Anal. Bioanal. Chem.*, 405 (2013) 1855–1864.
- [192] R. Xie, W. Johnson, L. Rodriguez, M. Gounder, G.S. Hall, B. Buckley, A study of the interactions between carboplatin and blood plasma proteins using size exclusion chromatography coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Bioanal. Chem.*, 387 (2007) 2815–2822.
- [193] I. Khalaila, C.S. Allardyce, C.S. Verma, P.J. Dyson, A mass spectrometric and molecular modelling study of cisplatin binding to transferrin, *ChemBioChem*, 6 (2005) 1788–1795.
- [194] A. Ivanov, J. Christodoulou, J. Parkinson, K. Barnham, a Tucker, S. Woodrow J,

- J. P, Cisplatin binding sites on human albumin, 273 (1998) 14721–14730.
- [195] A. Casini, G. Mastrobuoni, C. Temperini, C. Gabbiani, S. Francese, G. Moneti, C.T. Supuran, A. Scozzafava, L. Messori, ESI mass spectrometry and X-ray diffraction studies of adducts between anticancer platinum drugs and hen egg white lysozyme, *Chem. Commun. (Camb).*, (2007) 156–158.
- [196] R. Mandal, R. Kalke, X.-F. Li, Mass spectrometric studies of cisplatin-induced changes of hemoglobin, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 17 (2003) 2748–2754.
- [197] A. Casini, C. Gabbiani, G. Mastrobuoni, L. Messori, G. Moneti, G. Pieraccini, Exploring metallodrug-protein interactions by ESI mass spectrometry: the reaction of anticancer platinum drugs with horse heart cytochrome c, *ChemMedChem*, 1 (2006) 413–417.
- [198] T. Zhao, F.L. King, Mass-spectrometric characterization of cisplatin binding sites on native and denatured ubiquitin, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 16 (2011) 633–639.
- [199] A. V Karotki, M. Vas, Interaction of Metallothionein-2 with Platinum-Modified 5' -Guanosine, (2008) 10961–10969.
- [200] V. Calderone, A. Casini, S. Mangani, L. Messori, P.L. Orioli, Structural investigation of cisplatin-protein interactions: Selective platination of His19 in a cuprozinc superoxide dismutase, *Angew. Chemie - Int. Ed.*, 45 (2006) 1267–1269.
- [201] E. Zhmareva, G. Zegzhda, G. Kas'ian, O. Livenskaia, Interaction of proteins with platinum and palladium compounds with differing biological activities, *Ukr. Biokhimicheskii Zhurnal*, 68 (1996) 74–79.
- [202] A.R. Timerbaev, S.S. Aleksenko, K. Polec-Pawlak, R. Ruzik, O. Semenova, C.G. Hartinger, S. Oszwaldowski, M. Galanski, M. Jarosz, B.K. Keppler, Platinum metallodrug-protein binding studies by capillary electrophoresis-inductively coupled plasma-mass spectrometry: Characterization of interactions between Pt(II) complexes and human serum albumin, *Electrophoresis*, 25 (2004) 1988–1995.
- [203] L. Trynda-lemiesz, H. Koz, B.K. Keppler, Serum Albumin, *J. Inorg. Biochem.*, 77 (1999) 141–146.
- [204] W. Hu, Q. Luo, K. Wu, X. Li, F. Wang, Y. Chen, X. Ma, J. Wang, J. Liu, S. Xiong, P.J. Sadler, The anticancer drug cisplatin can cross-link the interdomain zinc site on human albumin, *Chem. Commun. (Camb).*, 47 (2011) 6006–6008.
- [205] J. Will, D.A. Wolters, W.S. Sheldrick, Characterisation of cisplatin binding sites in human serum proteins using hyphenated multidimensional liquid chromatography and ESI tandem mass spectrometry, *ChemMedChem*, 3 (2008) 1696–1707.
- [206] E. Moreno-Gordaliza, B. Cañas, M.A. Palacios, M.M. Gómez-Gómez, Characterization of Pt-protein complexes by nHPLC-ESI-LTQ MS/MS using a gel-based bottom-up approach, *Talanta*, 88 (2012) 599–608.
- [207] A. V. Rudnev, S.S. Aleksenko, O. Semenova, C.G. Hartinger, A.R. Timerbaev, B.K. Keppler, Determination of binding constants and stoichiometries for platinum anticancer drugs and serum transport proteins by capillary electrophoresis using the Hummel-Dreyer method, *J. Sep. Sci.*, 28 (2005) 121–127.
- [208] R. Mandal, R. Kalke, X.F. Li, Interaction of oxaliplatin, cisplatin, and carboplatin with hemoglobin and the resulting release of a heme group, *Chem. Res. Toxicol.*, 17 (2004) 1391–1397.
- [209] R. Mandal, C. Teixeira, X.-F. Li, Studies of cisplatin and hemoglobin interactions using nanospray mass spectrometry and liquid chromatography with

- inductively-coupled plasma mass spectrometry, *Analyst*, 128 (2003) 629–634.
- [210] S. Urien, J. Tillement, In vitro binding of oxaliplatin to human serum proteins, *Drug Interact. Intern Rapp. Sanofi Winthrop. Debiopharm Study Rep. No LPH0022*, (1995) 125–127.
- [211] J. Ni, Y. Wang, Q. Wang, L. Lu, Q. Zheng, No, *Zhongguo Yiyuan Yaoxue Zazhi*, 16 (1996) 246.
- [212] C.S. Allardyce, P.J. Dyson, F.R. Abou-Shakra, H. Birtwistle, J. Coffey, Inductively coupled plasma mass spectrometry to identify protein drug targets from whole cell systems Electronic supplementary information (ESI) available: full details of laser ablation ICP-MS and QTOF operating conditions, further experimental details fo, *Chem. Commun.*, (2001) 2708–2709.
- [213] G. Speelmans, W.H.H.M. Sips, R.J.H. Grisel, R.W.H.M. Staffhorst, A.M.J. Fichtinger-Schepman, J. Reedijk, B. De Kruijff, The interaction of the anti-cancer drug cisplatin with phospholipids is specific for negatively charged phospholipids and takes place at low chloride ion concentration, *Biochim. Biophys. Acta - Biomembr.*, 1283 (1996) 60–66.
- [214] L. Maurmann, R.N. Bose, Unwinding of zinc finger domain of DNA polymerase I by cis-diamminedichloroplatinum(II), *Dalton Trans.*, 39 (2010) 7968–79.
- [215] T. Zhao, F.L. King, A mass spectrometric comparison of the interactions of cisplatin and transplatin with myoglobin, *J. Inorg. Biochem.*, 104 (2010) 186–192.
- [216] H. Li, T. Lin, S.L. Van Orden, Y. Zhao, M.P. Barrow, A.M. Pizarro, Y. Qi, P.J. Sadler, P.B.O. Connor, Resonance Mass Spectrometry for Mapping Calmodulin Sites, *Anal. Chem.*, (2011) 9507–9515.
- [217] A. Pattanaiks, G. Bachowski, J. Laib, D. Lemkuil, C.F. Shaw, D.H. Petering, A. Hitchcock, L. Saryanll, Properties of the Reaction of cis-Dichlorodiammineplatinum (II) with Metallothionein, *Biochemistry*, (1992) 16121–16128.
- [218] P. Palumaa, O. Zerbe, M. Vasak, Formation and spectroscopic characterization of a novel monomeric cadmium- and phosphate-containing form of metallothionein, *Biochemistry*, 32 (1993) 2874–2879.
- [219] R. Mandal, G. Jiang, X.F. Li, Direct evidence for co-binding of cisplatin and cadmium to a native zinc- and cadmium-containing metallothionein, *Appl. Organomet. Chem.*, 17 (2003) 675–681.
- [220] D. Hagrman, J. Goodisman, A.-K. Souid, Kinetic study on the reactions of platinum drugs with glutathione, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 308 (2004) 658–666.
- [221] M. Kartalou, J.M. Essigmann, Mechanisms of resistance to cisplatin, *Mutat. Res. Mol. Mech. Mutagen.*, 478 (2001) 23–43.
- [222] L. Galluzzi, L. Senovilla, I. Vitale, J. Michels, I. Martins, O. Kepp, M. Castedo, G. Kroemer, Molecular mechanisms of cisplatin resistance, *Oncogene*, 31 (2012) 1869–1883.
- [223] B.L. Lum, G.A. Fisher, N.A. Brophy, A.M. Yahanda, K.M. Adler, S. Kaubisch, J. Halsey, B.I. Sikic, Clinical trials of modulation of multidrug resistance Pharmacokinetic and pharmacodynamic considerations, *Cancer*, 72 (1993) 3502–3514.
- [224] <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/?term=cisplatin+resistance>, (n.d.).
- [225] I.-S. Song, N. Savaraj, Z.H. Siddik, P. Liu, Y. Wei, C.J. Wu, M.T. Kuo, Role of human copper transporter Ctrl1 in the transport of platinum-based antitumor agents in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant cells, *Mol. Cancer Ther.*, 3 (2004) 1543–1549.

- [226] A.K. Holzer, G. Samimi, K. Katano, W. Naerdemann, X. Lin, R. Safaei, S.B. Howell, The copper influx transporter human copper transport protein 1 regulates the uptake of cisplatin in human ovarian carcinoma cells, *Mol. Pharmacol.*, 66 (2004) 817–823.
- [227] K. Nakayama, A. Kanzaki, K. Ogawa, K. Miyazaki, N. Neamati, Y. Takebayashi, Copper-transporting P-type adenosine triphosphatase (ATP7B) as a cisplatin based chemoresistance marker in ovarian carcinoma: Comparative analysis with expression of MDR1, MRP1, MRP2, LRP and BCRP, *Int. J. Cancer*, 101 (2002) 488–495.
- [228] C.A. Rabik, E.B. Maryon, K. Kasza, J.T. Shafer, C.M. Bartnik, M.E. Dolan, Role of copper transporters in resistance to platinating agents, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 64 (2009) 133–142.
- [229] B. Liedert, V. Materna, D. Schadendorf, J. Thomale, H. Lage, Overexpression of cMOAT (MRP2/ABCC2) is associated with decreased formation of platinum-DNA adducts and decreased G2-arrest in melanoma cells resistant to cisplatin, *J. Invest. Dermatol.*, 121 (2003) 172–176.
- [230] Y. Xu, N. Jiang, H. Yu, Effect of glutathione combined with cisplatin and oxaliplatin on the proliferation and apoptosis of lung carcinoma cell line, *Toxicol. Mech. Methods*, 20 (2010) 487–492.
- [231] C. Meijer, N.H. Mulder, G.A. Hospers, D.R. Uges, E.G. de Vries, The role of glutathione in resistance to cisplatin in a human small cell lung cancer cell line, *Br. J. Cancer*, 62 (1990) 72–77.
- [232] A.K. Godwin, A. Meister, P.J. O'Dwyer, C.S. Huang, T.C. Hamilton, M.E. Anderson, High resistance to cisplatin in human ovarian cancer cell lines is associated with marked increase of glutathione synthesis, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 89 (1992) 3070–3074.
- [233] S.S. Byun, S.W. Kim, H. Choi, C. Lee, E. Lee, Augmentation of cisplatin sensitivity in cisplatin-resistant human bladder cancer cells by modulating glutathione concentrations and glutathione-related enzyme activities, *BJU Int.*, 95 (2005) 1086–1090.
- [234] S. Goto, K. Kamada, Y. Soh, Y. Ihara, T. Kondo, Significance of Nuclear Glutathione S-Transferase pi in Resistance to Anti-cancer Drugs, *Jpn J Cancer Res*, 93 (2002) 1047–1056.
- [235] P. Surowiak, V. Materna, I. Kaplenko, M. Spaczyński, M. Dietel, H. Lage, M. Zabel, Augmented expression of metallothionein and glutathione S-transferase pi as unfavourable prognostic factors in cisplatin-treated ovarian cancer patients, *Virchows Arch.*, 447 (2005) 626–633.
- [236] B.A.J. Jansen, J. Brouwer, J. Reedijk, Glutathione induces cellular resistance against cationic dinuclear platinum anticancer drugs, *J. Inorg. Biochem.*, 89 (2002) 197–202.
- [237] S.L. Kelley, A. Basu, B.A. Teicher, M.P. Hacker, D.H. Hamer, J.S. Lazo, Overexpression of metallothionein confers resistance to anticancer drugs, *Science*, 241 (1988) 1813–1815.
- [238] M. Siegmund, C. Marx, O. Seeman, B. Schummer, A. Steidler, L. Toktomambetova, K. Kohrmann, J. Rassweiler, P. Alken, Cisplatin-resistant bladder carcinoma cells: enhanced expression of metallothioneins, *Urol. Res.*, 27 (1999) 157–163.
- [239] D.J. Smith, M. Jaggi, W. Zhang, A. Galich, C. Du, S.P. Sterrett, L.M. Smith, K.C. Balaji, Metallothioneins and resistance to cisplatin and radiation in prostate cancer, *Urology*, 67 (2006) 1341–1347.

- [240] T. Endo, M. Yoshikawa, M. Ebara, K. Kato, M. Sunaga, H. Fukuda, A. Hayasaka, F. Kondo, N. Sugiura, H. Saisho, Immunohistochemical metallothionein expression in hepatocellular carcinoma: Relation to tumor progression and chemoresistance to platinum agents, *J. Gastroenterol.*, 39 (2004) 1196–1201.
- [241] H. Toyoda, T. Mizushima, M. Satoh, N. Iizuka, A. Nomoto, HeLa Cell Transformants Overproducing Mouse Metallothionein Show in vivo Resistance to cis -Platinum in Nude Mice, (2000) 91–98.
- [242] Y. Muramatsu, Y. Hasegawa, H. Fukano, T. Ogawa, M. Namuba, K. Mouri, Y. Fujimoto, H. Matsuura, Y. Takai, M. Mori, Metallothionein immunoreactivity in head and neck carcinomas; special reference to clinical behaviors and chemotherapy responses, *Anticancer Res.*, 20 (2000) 257–264.
- [243] C. Meijer, A. Timmer, E.G.E. De Vries, J.P. Groten, A. Knol, N. Zwart, W.A. Dam, D.T. Sleijfer, N.H. Mulder, Role of metallothionein in cisplatin sensitivity of germ-cell tumours, *Int. J. Cancer*, 85 (2000) 777–781.
- [244] E.S.J. Arnér, H. Nakamura, T. Sasada, J. Yodoi, A. Holmgren, G. Spyrou, Analysis of the inhibition of mammalian thioredoxin, thioredoxin reductase, and glutaredoxin by cis-diamminedichloroplatinum (II) and its major metabolite, the glutathione-platinum complex, *Free Radic. Biol. Med.*, 31 (2001) 1170–1178.
- [245] Q. Li, J. Yu, C. Mu, M. Yunmbam, D. Slavsky, C. Cross, F. Bostick-Bruton, E. Reed, Association between the level of ERCC-1 expression and the repair of cisplatin-induced DNA damage in human ovarian cancer cells, *Anticancer Res.*, 20 (2000) 645–652.
- [246] M. Dabholkar, K. Thornton, J. Vionnet, F. Bostick-Bruton, J.J. Yu, E. Reed, Increased mRNA levels of xeroderma pigmentosum complementation group B (XPB) and Cockayne's syndrome complementation group B (CSB) without increased mRNA levels of multidrug-resistance gene (MDR1) or metallothionein-II (MT-II) in platinum-resistant human , *Biochem. Pharmacol.*, 60 (2000) 1611–1619.
- [247] S. Hector, W. Bolanowska-Higdon, J. Zdanowicz, S. Hitt, L. Pendyala, In vitro studies on the mechanisms of oxaliplatin resistance, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 48 (2001) 398–406.
- [248] S. Aebi, D. Fink, R. Gordon, H. Kim, H. Zheng, J. Fink, S. Howell, Resistance to cytotoxic drugs in DNA mismatch repair-deficient cells, *Clin. Cancer Res.*, 3 (1997) 1763–1767.
- [249] L. Yu, Z. Wang, Difference in expression of bcl-2 and bcl-xl genes in cisplatin-sensitive and cisplatin-resistant human in ovarian cancer cell lines, *J. Huazhong Univ. Sci. Technol. (Medical Sci.)*, 24 (2004) 151–153.
- [250] W. Wang, F. Rastinejad, W.S. El-Deiry, Restoring p53-dependent tumor suppression, *Cancer Biol. Ther.*, 2 (2003) 55–63.
- [251] J. Kigawa, S. Sato, M. Shimada, M. Takahashi, H. Itamochi, Y. Kanamori, N. Terakawa, p53 gene status and chemosensitivity in ovarian cancer, *Hum. Cell*, 14 (2001) 165–171.
- [252] X. Yao, K. Panichpisal, N. Kurtzman, K. Nugent, Cisplatin nephrotoxicity: a review, *Am. J. Med. Sci.*, 334 (2007) 115–124.
- [253] R. Safirstein, J. Winston, M. Goldstein, D. Moel, S. Dikman, J. Guttenplan, Cisplatin nephrotoxicity, *Am. J. Kidney Dis.*, 8 (1986) 356–367.
- [254] T. Taguchi, A. Nazneen, M.R. Abid, M.S. Razzaque, Cisplatin-associated nephrotoxicity and pathological events, *Contrib Nephrol*, 148 (2005) 107–121.
- [255] R.P. Miller, R.K. Tadagavadi, G. Ramesh, W.B. Reeves, Mechanisms of

- Cisplatin Nephrotoxicity, *Toxins* (Basel), 2 (2010) 2490–2518.
- [256] N. Pabla, Z. Dong, Cisplatin nephrotoxicity: mechanisms and renoprotective strategies, *Kidney Int.*, 73 (2008) 994–1007.
 - [257] I. Arany, R.L. Safirstein, Cisplatin nephrotoxicity, *Semin. Nephrol.*, 23 (2003) 460–464.
 - [258] M.K. Kuhlmann, G. Burkhardt, H. Köhler, Insights into potential cellular mechanisms of cisplatin nephrotoxicity and their clinical application, *Nephrol. Dial. Transplant*, 12 (1997) 2478–2480.
 - [259] E. Moreno-Gordaliza, C. Giesen, A. Lázaro, D. Esteban-Fernández, B. Humanes, B. Cañas, U. Panne, A. Tejedor, N. Jakubowski, M.M. Gómez-Gómez, Elemental bioimaging in kidney by LA-ICP-MS as a tool to study nephrotoxicity and renal protective strategies in cisplatin therapies, *Anal. Chem.*, 83 (2011) 7933–7940.
 - [260] Q. Huang, R.T. Dunn, S. Jayadev, O. DiSorbo, F.D. Pack, S.B. Farr, R.E. Stoll, K.T. Blanchard, Assessment of cisplatin-induced nephrotoxicity by microarray technology, *Toxicol. Sci.*, 63 (2001) 196–207.
 - [261] D. Esteban-Fernández, J.M. Verdaguer, R. Ramírez-Camacho, M.A. Palacios, M.M. Gómez-Gómez, Accumulation, fractionation, and analysis of platinum in toxicologically affected tissues after cisplatin, oxaliplatin, and carboplatin administration, *J. Anal. Toxicol.*, 32 (2008) 140–146.
 - [262] T.L. Cornelison, E. Reed, Nephrotoxicity and hydration management for cisplatin, carboplatin, and ormaplatin, *Gynecol. Oncol.*, 50 (1993) 147–158.
 - [263] P.T. Daley-yates, D.C.H. McBrien, A study of the protective effect of chloride salts on cisplatin nephrotoxicity, *Biochem. Pharmacol.*, 34 (1985) 2363–2369.
 - [264] J.T. Santoso, J.A. Lucci, R.L. Coleman, I. Schafer, E. V. Hannigan, Saline, mannitol, and furosemide hydration in acute cisplatin nephrotoxicity: A randomized trial, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 52 (2003) 13–18.
 - [265] M. Al-Sarraf, W. Fletcher, N. Oishi, R. Pugh, J. Hewlett, L. Balducci, J. McCracken, F. Padilla, Cisplatin hydration with and without mannitol diuresis in refractory disseminated malignant melanoma: a southwest oncology group study, *Cancer Treat. Rep.*, 66 (1982) 31–35.
 - [266] D. Lehane, A. Winston, R. Gray, Y. Daskal, The effect of diuretic pre-treatment on clinical, morphological and ultrastructural cis-platinum induced nephrotoxicity, *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.*, 5 (1979) 1393–1399.
 - [267] V. Launay-Vacher, J.B. Rey, C. Isnard-Bagnis, G. Deray, M. Daouphars, Prevention of cisplatin nephrotoxicity: State of the art and recommendations from the European Society of Clinical Pharmacy Special Interest Group on Cancer Care, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 61 (2008) 903–909.
 - [268] G. Ciarimboli, D. Deuster, A. Knief, M. Sperling, M. Holtkamp, B. Edemir, H. Pavenstädt, C. Lanvers-Kaminsky, A. am Zehnhoff-Dinnesen, A.H. Schinkel, H. Koepsell, H. Jürgens, E. Schlatter, Organic cation transporter 2 mediates cisplatin-induced oto- and nephrotoxicity and is a target for protective interventions, *Am. J. Pathol.*, 176 (2010) 1169–1180.
 - [269] N. Pabla, R.F. Murphy, K. Liu, Z. Dong, The copper transporter Ctr1 contributes to cisplatin uptake by renal tubular cells during cisplatin nephrotoxicity, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 296 (2009) F505–F511.
 - [270] S. Yasuyuki, S. Yoshihiko, T. Yoshio, H. Sadao, Protection against cisplatin-induced nephrotoxicity in the rat by inducers and an inhibitor of glutathione S-transferase, *Biochem. Pharmacol.*, 48 (1994) 453–459.
 - [271] D.M. Townsend, M.H. Hanigan, Inhibition of gamma-glutamyl transpeptidase or cysteine S-conjugate beta-lyase activity blocks the nephrotoxicity of cisplatin in

- mice, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 300 (2002) 142–8.
- [272] H. Uchino, Y. Matsumura, T. Negishi, F. Koizumi, T. Hayashi, T. Honda, N. Nishiyama, K. Kataoka, S. Naito, T. Kakizoe, Cisplatin-incorporating polymeric micelles (NC-6004) can reduce nephrotoxicity and neurotoxicity of cisplatin in rats, *Br. J. Cancer*, 93 (2005) 678–87.
- [273] M. Naziroğlu, A. Karaoğlu, A.O. Aksoy, Selenium and high dose vitamin E administration protects cisplatin-induced oxidative damage to renal, liver and lens tissues in rats, *Toxicology*, 195 (2004) 221–230.
- [274] L.M. Antunes, J.D. Darin, M.D. Bianchi, Protective effects of vitamin c against cisplatin-induced nephrotoxicity and lipid peroxidation in adult rats: a dose-dependent study, *Pharmacol. Res.*, 41 (2000) 405–411.
- [275] G. Karimi, M. Ramezani, Z. Tahoorian, Cisplatin nephrotoxicity and protection by milk thistle extract in rats, *Evidence-Based Complement. Altern. Med.*, 2 (2005) 383–386.
- [276] K. Cayir, A. Karadeniz, A. Yildirim, Y. Kalkan, A. Karakoc, M. Keles, S.B. Tekin, Protective effect of L-carnitine against cisplatin-induced liver and kidney oxidant injury in rats, *Cent. Eur. J. Med.*, 4 (2009) 184–191.
- [277] Y.N. Yu, H. Chen, Y. Li, Protect effect of bicyclol on cisplatin-induced nephrotoxicity in mice, *Arch. Toxicol.*, 83 (2009) 381–387.
- [278] M. Satoh, N. Kashihara, S. Fujimoto, A novel free radical scavenger, edarabone, protects against cisplatin-induced acute renal damage in vitro and in vivo, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 305 (2003) 1183–1190.
- [279] R. Seth, C. Yang, V. Kaushal, S. V Shah, G.P. Kaushal, P53-Dependent Caspase-2 Activation in Mitochondrial Release of Apoptosis-Inducing Factor and Its Role in Renal Tubular Epithelial Cell Injury, *J. Biol. Chem.*, 280 (2005) 31230–31239.
- [280] M. Jiang, X. Yi, S. Hsu, C. Wang, Z. Dong, Role of p53 in cisplatin-induced tubular cell apoptosis: dependence on p53 transcriptional activity, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 287 (2004) F1140–F1147.
- [281] Q. Wei, G. Dong, T. Yang, J. Megyesi, P.M. Price, Z. Dong, Activation and involvement of p53 in cisplatin-induced nephrotoxicity, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 293 (2007) F1282–91.
- [282] B.S. Cummings, R.G. Schnellmann, Cisplatin-Induced Renal Cell Apoptosis: Caspase 3-Dependent and -Independent Pathways, *J. Pharmacol. Exp. Ther.*, 302 (2002) 8–17.
- [283] G. Dong, J. Luo, V. Kumar, Z. Dong, Inhibitors of histone deacetylases suppress cisplatin-induced p53 activation and apoptosis in renal tubular cells, *Am. J. Physiol. Ren. Physiol.*, 298 (2010) F293–F300.
- [284] I. Arany, J. Herbert, Z. Herbert, R.L. Safirstein, Restoration of CREB function ameliorates cisplatin cytotoxicity in renal tubular cells, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 294 (2008) F577–81.
- [285] G.P. Kaushal, V. Kaushal, X. Hong, S. V. Shah, Role and regulation of activation of caspases in cisplatin-induced injury to renal tubular epithelial cells, *Kidney Int.*, 60 (2001) 1726–1736.
- [286] P.M. Price, R.L. Safirstein, J. Megyesi, Protection of renal cells from cisplatin toxicity by cell cycle inhibitors, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 286 (2004) F378–F384.
- [287] G. Ramesh, W.B. Reeves, Salicylate reduces cisplatin nephrotoxicity by inhibition of tumor necrosis factor-alpha, *Kidney Int.*, 65 (2004) 490–498.
- [288] G. Ramesh, W.B. Reeves, TNF-alpha mediates chemokine and cytokine expression and renal injury in cisplatin nephrotoxicity, *J. Clin. Invest.*, 110

- (2002) 835–842.
- [289] B. Zhang, G. Ramesh, S. Uematsu, S. Akira, W.B. Reeves, TLR4 signaling mediates inflammation and tissue injury in nephrotoxicity, *J. Am. Soc. Nephrol.*, 19 (2008) 923–932.
- [290] G. Ramesh, W.B. Reeves, p38 MAP kinase inhibition ameliorates cisplatin nephrotoxicity in mice, *Am. J. Physiol. Renal Physiol.*, 289 (2005) 166–74.
- [291] H.D.C. Francescato, R.S. Costa, F.B. Júnior, T.M. Coimbra, Effect of JNK inhibition on cisplatin-induced renal damage, *Nephrol. Dial. Transplant.*, 22 (2007) 2138–2148.
- [292] H. Haraguchi, H. Matura, No, Bitrel, Wako (Saitama), Ed. Enomoto, Fujiyoshida (Yamanashi), Japan, (2003).
- [293] H. Haraguchi, Metallomics as integrated biometal science, *J. Anal. At. Spectrom.*, 19 (2004) 5–14.
- [294] J. Szpunar, Metallomics: A new frontier in analytical chemistry, *Anal. Bioanal. Chem.*, 378 (2004) 54–56.
- [295] L. Castellanos-Serra, D. Paz-Lago, Inhibition of unwanted proteolysis during sample preparation: Evaluation of its efficiency in challenge experiments, *Electrophoresis*, 23 (2002) 1745–1753.
- [296] D.I. Jacobs, M.S. Van Rijssen, R. Van Der Heijden, R. Verpoorte, Sequential solubilization of proteins precipitated with trichloroacetic acid in acetone from cultured *Catharanthus roseus* cells yields 52% more spots after two-dimensional electrophoresis, *Proteomics*, 1 (2001) 1345–1350.
- [297] M.P. Nandakumar, J. Shen, B. Raman, M.R. Marten, Solubilization of trichloroacetic acid (TCA) precipitated microbial proteins via NaOH for two-dimensional electrophoresis, *J. Proteome Res.*, 2 (2003) 89–93.
- [298] L. Switzar, M. Giera, W.M.A. Niessen, Protein digestion: An overview of the available techniques and recent developments, *J. Proteome Res.*, 12 (2013) 1067–1077.
- [299] A. Shevchenko, H. Tomas, J. Havlis, J. V Olsen, M. Mann, In-gel digestion for mass spectrometric characterization of proteins and proteomes, *Nat. Protoc.*, 1 (2006) 2856–2860.
- [300] R.L. Gundry, M.Y. White, C.I. Murray, L.A. Kane, Q. Fu, B.A. Stanley, J.E. Van Eyk, A. Manuscript, C. Su, F. Yang, F. Long, D. Reyon, M.D. Routh, D. W, A.K. Mokhtari, J.D. Van Ornam, K.L. Rabe, J.A. Hoy, Y.J. Lee, K.R. Rajashankar, et al., Preparation of Proteins and Peptides for Mass Spectrometry Analysis in a Bottom-Up Proteomics Workflow, *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, 77 (2010) 342–355.
- [301] R.G. Sadygov, D. Cociorva, J.R. Yates, Large-scale database searching using tandem mass spectra: looking up the answer in the back of the book, *Nat. Methods*, 1 (2004) 195–202.
- [302] J.R. Wisniewski, A. Zougman, N. Nagaraj, M. Mann, Universal sample preparation method for proteome analysis, *Nat Methods*, 6 (2009) 359–362.
- [303] J.R. Wisniewski, N. Nagaraj, A. Zougman, F. Gnad, M. Mann, Brain phosphoproteome obtained by a fasp-based method reveals plasma membrane protein topology, *J. Proteome Res.*, 9 (2010) 3280–3289.
- [304] J.R. Wisniewski, D.F. Zielinska, M. Mann, Comparison of ultrafiltration units for proteomic and N-glycoproteomic analysis by the filter-aided sample preparation method, *Anal. Biochem.*, 410 (2011) 307–309.
- [305] L. Switzar, M. Giera, H. Lingeman, H. Irth, W.M.A. Niessen, Protein digestion optimization for characterization of drug-protein adducts using response surface modeling, *J. Chromatogr. A*, 1218 (2011) 1715–1723.

- [306] J. Norrgran, T.L. Williams, A.R. Woolfitt, M.I. Solano, J.L. Pirkle, J.R. Barr, Optimization of digestion parameters for protein quantification, *Anal. Biochem.*, 393 (2009) 48–55.
- [307] S.J. Bark, N. Muster, J.R. Yates, G. Siuzdak, High-temperature protein mass mapping using a thermophilic protease, *J. Am. Chem. Soc.*, 123 (2001) 1774–1775.
- [308] J. Havlis, H. Thomas, M. Sebela, A. Shevchenko, Fast-response proteomics by accelerated in-gel digestion of proteins, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 1300–1306.
- [309] D. Lopez-Ferrer, J.L. Capelo, J. Vazquez, Ultra fast trypsin digestion of proteins by high intensity focused ultrasound, *J. Proteome Res.*, 4 (2005) 1569–1574.
- [310] Z.M. Segu, L. Hammad, Y. Mechref, Rapid and efficient glycoprotein identification through microwave-assisted enzymatic digestion, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 24 (2010) 3461–3468.
- [311] S. Wang, T. Liu, L. Zhang, G. Chen, Efficient chymotryptic proteolysis enhanced by infrared radiation for peptide mapping, *J. Proteome Res.*, 7 (2008) 5049–5054.
- [312] S. Wang, L. Zhang, P. Yang, G. Chen, Infrared-assisted tryptic proteolysis for peptide mapping, *Proteomics*, 8 (2008) 2579–2582.
- [313] H.-J. Yang, J. Hong, S. Lee, S. Shin, J. Kim, J. Kim, Pressure-assisted tryptic digestion using a syringe, *Rapid Commun. Mass Spectrom.*, 24 (2010) 901–908.
- [314] B. Bogdanov, R.D. Smith, Proteomics by fticr mass spectrometry: TOP down and bottom up, *Mass Spectrom. Rev.*, 24 (2005) 168–200.
- [315] M.L. Fournier, J.M. Gilmore, S.A. Martin-Brown, M.P. Washburn, Multidimensional separations-based shotgun proteomics, *Chem. Rev.*, 107 (2007) 3654–3686.
- [316] L. Florens, M.P. Washburn, Proteomic analysis by multidimensional protein identification technology, *Methods Mol. Biol.*, 328 (2006) 159–175.
- [317] D. Calligaris, C. Villard, D. Lafitte, Advances in top-down proteomics for disease biomarker discovery, *J. Proteomics*, 74 (2011) 920–934.
- [318] T. Rabilloud, C. Lelong, Two-dimensional gel electrophoresis in proteomics: A tutorial, *J. Proteomics*, 74 (2011) 1829–1841.
- [319] O. Carrette, P.R. Burkhard, J.-C. Sanchez, D.F. Hochstrasser, State-of-the-art two-dimensional gel electrophoresis: a key tool of proteomics research, *Nat. Protoc.*, 1 (2006) 812–823.
- [320] P.H. O’Farrell, High Resolution of Proteins, Electrophoresis, *J. Biol. Chem.*, 250 (1975) 4007–4021.
- [321] J. Klose, Protein mapping by combined isoelectric focusing and electrophoresis of mouse tissues A novel approach to testing for induced point mutations in mammals, *Humangenetik*, 26 (1975) 231–243.
- [322] W.W. Wu, G. Wang, S.J. Baek, R. Shen, Comparative Study of Three Proteomic Quantitative Methods, DIGE, cICAT, and iTRAQ, Using 2D Gel- or LC–MALDI TOF/TOF, *J. Proteome Res.*, 5 (2006) 651–658.
- [323] J. Klose, U. Kobalz, Two-dimensional electrophoresis of proteins: an updated protocol and implications for a functional analysis of the genome, *Electrophoresis*, 16 (1995) 1034–1059.
- [324] J. Corbett, M.J. Dunn, A. Posch, A. Görg, Positional reproducibility of protein spots in two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis using immobilised pH gradient isoelectric focusing in the first dimension: An interlaboratory comparison, *Electrophoresis*, 15 (1994) 1205–1211.
- [325] B. Bjellqvist, K. Ek, P.G. Righetti, E. Gianazza, a Görg, R. Westermeier, W. Postel, Isoelectric focusing in immobilized pH gradients: principle, methodology

- and some applications, *J. Biochem. Biophys. Methods*, 6 (1982) 317–339.
- [326] P. Mauri, M. Scigelova, Multidimensional protein identification technology for clinical proteomic analysis, *Clin. Chem. Lab. Med.*, 47 (2009) 636–645.
- [327] A. Moreda-Piñero, N. García-Otero, P. Bermejo-Barrera, A review on preparative and semi-preparative offgel electrophoresis for multidimensional protein/peptide assessment, *Anal. Chim. Acta*, 836 (2014) 1–17.
- [328] C. Franchin, M. Pivato, M. Rattazzi, G. Arrigoni, R. Million, OFFGEL fractionation of peptides: Where really is your sample?, *J. Chromatogr. A*, 1355 (2014) 278–283.
- [329] E. Tobolkina, F. Cortés-Salazar, D. Momotenko, J. Maillard, H.H. Girault, Segmented field OFFGEL® electrophoresis, *Electrophoresis*, 33 (2012) 3331–3338.
- [330] P. Hörth, T. Preckel, C. a Miller, Efficient peptide fractionation and improved protein identification with the Agilent 3100 OFFGEL Fractionator Authors, *Mol. Cell. Proteomics MCP*, 5 (2006) 1968–74.
- [331] P. Hörth, C. a Miller, T. Preckel, C. Wenz, Efficient fractionation and improved protein identification by peptide OFFGEL electrophoresis, *Mol. Cell. Proteomics*, 5 (2006) 1968–1974.
- [332] R.D.M. O’Cualain, J.E. Hyde, P.F.G. Sims, A protein-centric approach for the identification of folate enzymes from the malarial parasite, *Plasmodium falciparum*, using OFFGEL™ solution-based isoelectric focussing and mass spectrometry, *Malar. J.*, 9 (2010) 286.
- [333] S. Magdeldin, K. Yamamoto, Y. Yoshida, B. Xu, Y. Zhang, H. Fujinaka, E. Yaoita, J.R. Yates, T. Yamamoto, Deep proteome mapping of mouse kidney based on OFFGel prefractionation reveals remarkable protein post-translational modifications, *J. Proteome Res.*, 13 (2014) 1636–1646.
- [334] P.R. Sudhir, M.P. Kumari, W.T. Hsu, J. Massiot, C.H. Chen, H.C. Kuo, C.H. Chen, Quantitative proteomics of protein complexes and their implications for cell reprogramming and pluripotency, *J. Proteome Res.*, 12 (2013) 5878–5890.
- [335] C. Abdallah, E. Dumas-Gaudot, J. Renaut, K. Sergeant, Gel-based and gel-free quantitative proteomics approaches at a glance, *Int. J. Plant Genomics*, 2012 (2012).
- [336] S. Magdeldin, A. Elguoshy, Y. Yoshida, Y. Hirao, B. Xu, Y. Zhang, K. Yamamoto, H. Takimoto, H. Fujinaka, N. Kinoshita, T. Yamamoto, Complementary Protein and Peptide OFFGEL Fractionation for High-Throughput Proteomic Analysis, *Anal. Chem.*, 87 (2015) 8481–8488.
- [337] J. Bianga, G. Ballihaut, C. Pecheyran, Z. Touat, H. Preud’homme, S. Mounicou, L. Chavatte, R. Lobinski, J. Szpunar, Detection of selenoproteins in human cell extracts by laser ablation-ICP MS after separation by polyacrylamide gel electrophoresis and blotting, *J. Anal. At. Spectrom.*, 27 (2012) 25–32.
- [338] J.S. Becker, M. Przybylski, Studies of structure and phosphorylation of tau protein using high resolution mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.*, 22 (2007) 761–765.
- [339] R. Lobinski, J.S. Becker, H. Haraguchi, B. Sarkar, Metallomics: Guidelines for terminology and critical evaluation of analytical chemistry approaches (IUPAC Technical Report), *Pure Appl. Chem.*, 82 (2010) 493–504.
- [340] E. Moreno-Gordaliza, B. Cañas, M. a Palacios, M.M. Gómez-Gómez, Novel insights into the bottom-up mass spectrometry proteomics approach for the characterization of Pt-binding proteins: The insulin-cisplatin case study, *Analyst*, 135 (2010) 1288–98.

- [341] I. Khalaila, A. Bergamo, F. Bussy, G. Sava, P.J. Dyson, The role of cisplatin and NAMI-A plasma-protein interactions in relation to combination therapy, *Int. J. Oncol.*, 29 (2006) 261–268.
- [342] E. Moreno-Gordaliza, D. Esteban-Fernández, C. Giesen, K. Lehmann, A. Lázaro, A. Tejedor, C. Scheler, B. Cañas, N. Jakubowski, M.W. Linscheid, M.M. Gómez-Gómez, LA-ICP-MS and nHPLC-ESI-LTQ-FT-MS/MS for the analysis of cisplatin–protein complexes separated by two dimensional gel electrophoresis in biological samples, *J. Anal. At. Spectrom.*, 27 (2012) 1474.
- [343] A. Sanz-Medel, Trace element analytical speciation in biological systems: Importance, challenges and trends, *Spectrochim. Acta, Part B At. Spectrosc.*, 53 (1998) 197–211.
- [344] A. Rodríguez-Cea, M. del Rosario Fernández de la Campa, E. Blanco González, B. Andón Fernández, A. Sanz-Medel, Metal speciation analysis in eel (*Anguilla anguilla*) metallothioneins by anionic exchange-FPLC-isotope dilution-ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.*, 18 (2003) 1357.
- [345] M.E. Del Castillo Busto, M. Montes-Bayón, A. Sanz-Medel, Accurate determination of human serum transferrin isoforms: Exploring metal-specific isotope dilution analysis as a quantitative proteomic tool, *Anal. Chem.*, 78 (2006) 8218–8226.
- [346] P. Hemström, K. Irgum, *Hydrophilic interaction chromatography*, 2006.
- [347] P. Jandera, Stationary and mobile phases in hydrophilic interaction chromatography: A review, *Anal. Chim. Acta*, 692 (2011) 1–25.
- [348] P.J. Boersema, S. Mohammed, A.J.R. Heck, Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) in proteomics, *Anal. Bioanal. Chem.*, 391 (2008) 151–159.
- [349] L. Ouerdane, S. Mari, P. Czernic, M. Lebrun, R. Lobinski, Speciation of non-covalent nickel species in plant tissue extracts by electrospray Q-TOFMS/MS after their isolation by 2D size exclusion-hydrophilic interaction LC (SEC-HILIC) monitored by ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.*, 21 (2006) 676–683.
- [350] A. Martinčič, M. Cemazar, G. Sersa, V. Kovač, R. Milačič, J. Ščančar, A novel method for speciation of Pt in human serum incubated with cisplatin, oxaliplatin and carboplatin by conjoint liquid chromatography on monolithic disks with UV and ICP-MS detection, *Talanta*, 116 (2013) 141–148.
- [351] A. Martinčič, R. Milačič, J. Vidmar, I. Turel, B.K. Keppler, J. Ščančar, New method for the speciation of ruthenium-based chemotherapeutics in human serum by conjoint liquid chromatography on affinity and anion-exchange monolithic disks, *J. Chromatogr. A*, 1371 (2014) 168–176.
- [352] A. Sanz-Medel, M. Montes-Bayón, M.D.R.F. De La Campa, J.R. Encinar, J. Bettmer, Elemental mass spectrometry for quantitative proteomics, *Anal. Bioanal. Chem.*, 390 (2008) 3–16.
- [353] J. Szpunar, Advances in analytical methodology for bioinorganic speciation analysis: metallomics, metalloproteomics and heteroatom-tagged proteomics and metabolomics, *Analyst*, 130 (2005) 442–65.
- [354] R. Łobiński, D. Schaumlöffel, J. Szpunar, Mass spectrometry in bioinorganic analytical chemistry, *Mass Spectrom. Rev.*, 25 (2006) 255–289.
- [355] R. Nageswara Rao, M.V.N. Kumar Talluri, An overview of recent applications of inductively coupled plasma-mass spectrometry (ICP-MS) in determination of inorganic impurities in drugs and pharmaceuticals, *J. Pharm. Biomed. Anal.*, 43 (2007) 1–13.
- [356] C.G. Vogiatzis, G.A. Zachariadis, Tandem mass spectrometry in metallomics and

- the involving role of ICP-MS detection: A review, *Anal. Chim. Acta*, 819 (2014) 1–14.
- [357] J.S. Becker, *Inorganic Mass Spectrometry: Principles and Applications*, 3rd ed., Chichester, 2007.
- [358] H. Riepe, M.M. Gómez-Gómez, C. Cámara, J. Bettmer, Feasibility studies on the suppression of HfO^+ mass interferences on platinum determination by inductively coupled plasma mass spectrometry (ICP-MS) by modification of the sample introduction system, *J. Anal. At. Spectrom.*, 15 (2000) 507–511.
- [359] Z. Yang, X. Hou, B.T. Jones, Determination of Platinum in Clinical Samples, *Appl. Spectrosc. Rev.*, 37 (2002) 57–88.
- [360] S. Majumdar, J.R. Peralta-Videa, H. Castillo-Michel, J. Hong, C.M. Rico, J.L. Gardea-Torresdey, Applications of synchrotron ??-XRF to study the distribution of biologically important elements in different environmental matrices: A review, *Anal. Chim. Acta*, 755 (2012) 1–16.
- [361] J. Vickerman, N. Winograd, Cluster TOF-SIMS Imaging and the Characterization of Biological Materials, *Clust. Second. Ion Mass Spectrom. Princ. Appl.*, (2013) 269–312.
- [362] J.S. Becker, M. Zoriy, A. Matusch, B. Wu, D. Salber, C. Palm, J.S. Becker, Bioimaging of metals by Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (LA-ICP-MS), *Mass Spectrom. Rev.*, 29 (2010) 156–175.
- [363] A. Kindness, C.N. Sekaran, Two-Dimensional Mapping of Copper and Zinc in Liver Sections by Laser Ablation – Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Methods: A prepared homogeneous Certified Reference, Online, 1923 (2003) 1916–1923.
- [364] V. Trunova, A. Sidorina, V. Zvereva, B. Churin, Changes in the elemental content of rat heart as a result of the fixation in formalin analyzed by synchrotron radiation X-ray fluorescent analysis, *J. Trace Elem. Med. Biol.*, 27 (2013) 76–77.
- [365] D.J. Hare, J.L. George, R. Grimm, S. Wilkins, P.A. Adlard, R.A. Cherny, A.I. Bush, D.I. Finkelstein, P. Doble, Three-dimensional elemental bio-imaging of Fe, Zn, Cu, Mn and P in a 6-hydroxydopamine lesioned mouse brain, *Metallomics*, 2 (2010) 745–53.
- [366] A. Matusch, C. Depboylu, C. Palm, B. Wu, G.U. Höglinger, M.K.H. Schäfer, J.S. Becker, Cerebral Bioimaging of Cu, Fe, Zn, and Mn in the MPTP Mouse Model of Parkinson's Disease Using Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry (LA-ICP-MS), *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 21 (2010) 161–171.
- [367] J. Feldmann, A. Kindness, P. Ek, Laser ablation of soft tissue using a cryogenically cooled ablation cell, *J. Anal. At. Spectrom.*, 17 (2002) 813–818.
- [368] J.S. Becker, A. Matusch, B. Wu, Bioimaging mass spectrometry of trace elements - recent advance and applications of LA-ICP-MS: A review, *Anal. Chim. Acta*, 835 (2014) 1–18.
- [369] J. Sabine Becker, Imaging of metals in biological tissue by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry (LA-ICP-MS): state of the art and future developments, *J. Mass Spectrom.*, 48 (2013) 255–268.
- [370] M. Bonta, H. Lohninger, V. Laszlo, B. Hegedus, A. Limbeck, Quantitative LA-ICP-MS imaging of platinum in chemotherapy treated human malignant pleural mesothelioma samples using printed patterns as standard, *J. Anal. At. Spectrom.*, 29 (2014) 2159–2167.
- [371] A.E. Egger, S. Theiner, C. Kornauth, P. Heffeter, W. Berger, B.K. Keppler, C.G. Hartinger, Quantitative bioimaging by LA-ICP-MS: a methodological study on the distribution of Pt and Ru in viscera originating from cisplatin- and KP1339-

- treated mice, *Metallomics*, 6 (2014) DOI: 10.1039/C4MT00072B.
- [372] M. Zoriy, A. Matusch, T. Spruss, J.S. Becker, Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry for imaging of copper, zinc, and platinum in thin sections of a kidney from a mouse treated with cis-platin, *Int. J. Mass Spectrom.*, 260 (2007) 102–106.
- [373] O. Reifschneider, C.A. Wehe, K. Diebold, C. Becker, M. Sperling, U. Karst, Elemental bioimaging of haematoxylin and eosin-stained tissues by laser ablation ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.*, 28 (2013) 989–993.
- [374] O. Reifschneider, C.A. Wehe, I. Raj, J. Ehmcke, G. Ciarimboli, M. Sperling, U. Karst, Quantitative bioimaging of platinum in polymer embedded mouse organs using laser ablation ICP-MS, *Metallomics*, 5 (2013) 1440–1447.
- [375] E. Hoffmann, C. Lüdke, H. Scholze, Is laser-ablation-ICP-MS an alternative to solution analysis of solid samples?, *Fresenius. J. Anal. Chem.*, 359 (1997) 394–398.
- [376] D. Gunther, B. Hattendorf, Elemental fractionation in LA-ICP-MS, *Laser-Ablation-ICP-MS Earth Sci.*, 29 (2001) 83–91.
- [377] C.C. Garcia, H. Lindner, K. Niemax, Laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry—current shortcomings, practical suggestions for improving performance, and experiments to guide future development, *J. Anal. At. Spectrom.*, 24 (2009) 14–26.
- [378] B. Fernández, F. Claverie, C. Pécheyran, O.F.X. Donard, F. Claverie, Direct analysis of solid samples by fs-LA-ICP-MS, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 26 (2007) 951–966.
- [379] A.S. Darke, F.J. Tyson, Interaction of laser radiation with solid materials and its significance to analytical spectrometry A review, *J. Anal. At. Spectrom.*, 8 (1993) 145–209.
- [380] F.A. Orellana, C.G. Gálvez, F.A. Orellana, C.G. Gálvez, M.T. Roldán, C. García-Ruiz, M.T. Roldán, C. García-Ruiz, Applications of laser-ablation-inductively-coupled plasma-mass spectrometry in chemical analysis of forensic evidence, *TrAC - Trends Anal. Chem.*, 42 (2013) 1–34.
- [381] C. Austin, F. Fryer, J. Lear, D. Bishop, D. Hare, T. Rawling, L. Kirkup, A. McDonagh, P. Doble, Factors affecting internal standard selection for quantitative elemental bio-imaging of soft tissues by LA-ICP-MS, *J. Anal. At. Spectrom.*, 26 (2011) 1494.
- [382] D.J. Hare, J.K. Lee, A.D. Beavis, A. Van Gramberg, J. George, P.A. Adlard, D.I. Finkelstein, P.A. Doble, Three-dimensional atlas of iron, copper, and zinc in the mouse cerebrum and brainstem, *Anal. Chem.*, 84 (2012) 3990–3997.
- [383] D.A. Frick, D. Günther, Fundamental studies on the ablation behaviour of carbon in LA-ICP-MS with respect to the suitability as internal standard, *J. Anal. At. Spectrom.*, 27 (2012) 1294.
- [384] P. Austin, Christine, Hare, Dominic, Rawling, Tristan, Mc Donagh, Andrew M, Doble, Quantification method for elemental bio-imaging by LA-ICP-MS using metal spiked PMMA films, *J. Anal. At. Spectrom.*, 25 (2010) 722–725.
- [385] I. Konz, B. Fernández, M.L. Fernández, R. Pereiro, H. González, L. Álvarez, M. Coca-Prados, A. Sanz-Medel, Gold internal standard correction for elemental imaging of soft tissue sections by LA-ICP-MS: Element distribution in eye microstructures, *Anal. Bioanal. Chem.*, 405 (2013) 3091–3096.
- [386] M. Bonta, H. Lohninger, M. Marchetti-Deschmann, A. Limbeck, Application of gold thin-films for internal standardization in LA-ICP-MS imaging experiments, *Analyst*, 139 (2014) 1521–31.

- [387] S. Hoesl, B. Neumann, S. Techritz, M.W. Linscheid, F. Theuring, C. Scheler, N. Jakubowski, L. Mueller, Development of a calibration and standardization procedure for LA-ICP-MS using a conventional ink-jet printer for quantification of proteins in electro- and Western-blot assays, *J. Anal. At. Spectrom.*, 450 (2014) 1282–1291.
- [388] J.S. Becker, M. V Zoriy, M. Dehnhardt, C. Pickhardt, K. Zilles, Copper , zinc , phosphorus and sulfur distribution in thin section of rat brain tissues measured by laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry : possibility for small-size tumor analysis, *J. Anal. At. Spectrom.*, 20 (2005) 912–917.
- [389] J.S. Becker, M. V Zoriy, C. Pickhardt, K. Zilles, Imaging of Copper , Zinc , and Other Elements in Thin Section of Human Brain Samples (Hippocampus) by Laser Ablation Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *Anal. Chem.*, 77 (2005) 3208–3216.
- [390] J. O'Reilly, D. Douglas, J. Braybrook, P.-W. So, E. Vergucht, J. Garrevoet, B. Vekemans, L. Vincze, H. Goenaga-Infante, A novel calibration strategy for the quantitative imaging of iron in biological tissues by LA-ICP-MS using matrix-matched standards and internal standardisation, *J. Anal. At. Spectrom.*, 29 (2014) 1378.
- [391] D.J. Hare, J. Lear, D. Bishop, A. Beavis, P.A. Doble, Protocol for production of matrix-matched brain tissue standards for imaging by laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Anal. Methods*, 5 (2013) 1915–1921.
- [392] D. Hare, C. Austin, P. Doble, Quantification strategies for elemental imaging of biological samples using laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Analyst*, 137 (2012) 1527.
- [393] D. Hare, B. Reedy, R. Grimm, S. Wilkins, I. Volitakis, J.L. George, R.A. Cherny, A.I. Bush, D.I. Finkelstein, P. Doble, Quantitative elemental bio-imaging of Mn, Fe, Cu and Zn in 6-hydroxydopamine induced Parkinsonism mouse models, *Metallomics*, 1 (2009) 53–58.
- [394] A. Matusch, L.S. Fenn, C. Depboylu, M. Kietz, S. Strohmer, J.A. McLean, J.S. Becker, Combined elemental and biomolecular mass spectrometry imaging for probing the inventory of tissue at a micrometer scale, *Anal. Chem.*, 84 (2012) 3170–3178.
- [395] D.J. Hare, J. Lear, D. Bishop, A. Beavis, P.A. Doble, Protocol for production of matrix-matched brain tissue standards for imaging by laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry, *Anal. Methods*, 5 (2013) 1915–1921.
- [396] M. Thompson, S. Chenery, L. Brett, Calibration studies in laser ablation microprobe-inductively coupled plasma atomic emission spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.*, 4 (1989) 11–16.
- [397] C. Pickhardt, A. V Izmer, M. V Zoriy, D. Schauml, J.S. Becker, On-line isotope dilution in laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry using a microflow nebulizer inserted in the laser ablation chamber, *Int. J. Mass Spectrom.*, 248 (2006) 136–141.
- [398] C. Pickhardt, J.S. Becker, H.J. Dietze, A new strategy of solution calibration in laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry for multielement trace analysis of geological samples, *Fresenius. J. Anal. Chem.*, 368 (2000) 173–181.
- [399] D. Günther, H. Cousin, B. Magyar, I. Leopold, Calibration Studies on Dried Aerosols for Laser Ablation?Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.*, 12 (1997) 165–170.
- [400] S. Boulyga, C. Pickhardt, J.S. Becker, New approach of solution-based

- calibration in laser ablation inductively coupled plasma mass Spectrometry of trace elements in metals and reduction of Fractionation effects, *At. Spectrosc.*, 25 (2004) 53–63.
- [401] R.S. Houk, R.K. Winge, X. Chen, High Speed Photographic Study of Wet Droplets and Solid Particles in the Inductively Coupled Plasma, *J. Anal. At. Spectrom.*, 12 (1997) 1139–1148.
- [402] D.B. Aeschliman, S.J. Bajic, D.P. Baldwin, R.S. Houk, Spatially-resolved analysis of solids by laser ablation-inductively coupled plasma-mass spectrometry: trace elemental quantification without matrix-matched solid standards, *J. Anal. At. Spectrom.*, 18 (2003) 872.
- [403] C. O'Connor, B.L. Sharp, P. Evans, On-line additions of aqueous standards for calibration of laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry: theory and comparison of wet and dry plasma conditions, *J. Anal. At. Spectrom.*, 21 (2006) 556.
- [404] K.G. Heumann, Isotope-dilution ICP-MS for trace element determination and speciation: from a reference method to a routine method?, *Anal. Bioanal. Chem.*, 378 (2004) 318–329.
- [405] P.-L. Lu, K.-S. Huang, S.-J. Jiang, Determination of traces of copper, cadmium and lead in biological and environmental samples by flow-injection isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry, *Anal. Chim. Acta*, 284 (1993) 181–188.
- [406] J. Enzweiler, P.J. Potts, K.E. Jarvis, Determination of Platinum, Palladium, Ruthenium and Iridium in Geological Samples by Isotope Dilution Inductively Coupled Plasma Mass Spectrometry Using a Sodium Peroxide Fusion and Tellurium Coprecipitation, *Analyst*, 120 (1995) 1391–1396.
- [407] A.A. Brown, L. Ebdon, S.J. Hill, Development of a coupled liquid chromatography-isotope dilution inductively coupled plasma mass spectrometry method for lead speciation, *Anal. Chim. Acta*, 286 (1994) 391–399.
- [408] K.G. Heumann, L. Rottmann, J. Vogl, Elemental speciation with liquid chromatography-inductively coupled plasma isotope dilution mass spectrometry, *J. Anal. At. Spectrom.*, 9 (1994) 1351–1355.
- [409] M. Tibi, K.G. Heumann, Multi-element trace determinations in pure alkaline earth fluoride powders by high-resolution ICP-MS using wet-chemical sample preparation and laser ablation, *Anal. Bioanal. Chem.*, (2003) 126–131.
- [410] J.S. Becker, C. Pickhardt, W. Pompe, Determination of Ag, Tl, and Pb in few milligrams of platinum nanoclusters by on-line isotope dilution in laser ablation inductively coupled plasma mass spectrometry, *Int. J. Mass Spectrom.*, 237 (2004) 13–17.
- [411] J. Moser, W. Wegscheider, T. Meisel, N. Fellner, An uncertainty budget for trace analysis by isotope-dilution ICP-MS with proper consideration of correlation, *Anal. Bioanal. Chem.*, 377 (2003) 97–110.
- [412] M. Karas, R. Krüger, Ion formation in MALDI: The cluster ionization mechanism, *Chem. Rev.*, 103 (2003) 427–439.
- [413] M. Andersson, M.R. Groseclose, A.Y. Deutch, R.M. Caprioli, Imaging mass spectrometry of proteins and peptides: 3D volume reconstruction, *Nat. Methods*, 5 (2008) 101–108.
- [414] J. Bianga, A. Bouslimani, N. Bec, F. Quenet, S. Mounicou, J. Szpunar, B. Bouyssiére, R. Lobinski, C. Larroque, Complementarity of MALDI and LA ICP mass spectrometry for platinum anticancer imaging in human tumor, *Metallomics*, 6 (2014).

- [415] A. Vujačić, Ž.D. Bugarčić, J. Schiller, V. Vasić, M. Petković, Matrix-assisted laser desorption and ionisation time-of-flight mass spectrometry of Pt(II) and Pd(II) complexes, *Polyhedron*, 28 (2009) 2905–2912.
- [416] Y. Nuevo Ordoñez, M. Montes-Bayón, E. Blanco-González, A. Sanz-Medel, Quantitative analysis and simultaneous activity measurements of Cu, Zn-superoxide dismutase in red blood cells by HPLC-ICPMS, *Anal. Chem.*, 82 (2010) 2387–2394.
- [417] A. Dahlin, <http://visualizeyourscience.com/>, (n.d.).
- [418] A. R. Timerbaev, K. Pawlak, C. Gabbiani, L. Messori, Recent progress in the application of analytical techniques to anticancer metallodrug proteomics, *TrAC Trends Anal. Chem.*, 30 (2011) 1120–1138.
- [419] A. Makarov, Electrostatic axially harmonic orbital trapping: A high-performance technique of mass analysis, *Anal. Chem.*, 72 (2000) 1156–1162.
- [420] J. Mitchell Wells, S.A. McLuckey, Collision-induced dissociation (CID) of peptides and proteins, *Methods Enzymol.*, 402 (2005) 148–185.
- [421] B. Paizs, S. Suhai, Fragmentation pathways of protonated peptides, *Mass Spectrom. Rev.*, 24 (2005) 508–548.
- [422] J. V. Olsen, B. Macek, O. Lange, A. Makarov, S. Horning, M. Mann, Higher-energy C-trap dissociation for peptide modification analysis, *Nat. Methods*, 4 (2007) 709–712.
- [423] F.W. McLafferty, D.M. Horn, K. Breuker, Y. Ge, M.A. Lewis, B. Cerda, R.A. Zubarev, B.K. Carpenter, Electron capture dissociation of gaseous multiply charged ions by Fourier-transform ion cyclotron resonance, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 12 (2001) 245–9.
- [424] J.E.P. Syka, J.J. Coon, M.J. Schroeder, J. Shabanowitz, D.F. Hunt, Peptide and protein sequence analysis by electron transfer dissociation mass spectrometry, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, 101 (2004) 9528–33.
- [425] D.M. Good, M. Wirtala, G.C. McAlister, J.J. Coon, Performance characteristics of electron transfer dissociation mass spectrometry, *Mol. Cell. Proteomics*, 6 (2007) 1942–51.
- [426] R.E. Ardrey, *Liquid Chromatography - Mass Spectrometry: An Introduction*, John Wiley & Sons, Ltd, 2003.
- [427] W.J. Henzel, C. Watanabe, J.T. Stults, Protein identification: The origins of peptide mass fingerprinting, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 14 (2003) 931–942.
- [428] C.G. Hartinger, W.H. Ang, A. Casini, L. Messori, B.K. Keppler, P.J. Dyson, Mass spectrometric analysis of ubiquitin-platinum interactions of leading anticancer drugs: MALDI versus ESI, *J. Anal. At. Spectrom.*, 22 (2007) 960–967.
- [429] T. Zhao, F.L. King, Direct Determination of the Primary Binding Site of Cisplatin on Cytochrome c by Mass Spectrometry, *J. Am. Soc. Mass Spectrom.*, 20 (2009) 1141–1147.
- [430] M. Knipp, A. V Karotki, S. Chesnov, G. Natile, P.J. Sadler, V. Brabec, M. Vas, D. Farmaco-chimico, Reaction of Zn 7 Metallothionein with cis- and trans- [Pt (N-donor) 2 Cl 2] Anticancer Complexes : trans-Pt II Complexes Retain Their N-Donor Ligands, *Society*, (2007) 4075–4086.
- [431] C.M. Sze, G.N. Khairallah, Z. Xiao, P.S. Donnelly, R.A.J. O’Hair, A.G. Wedd, Interaction of cisplatin and analogues with a Met-rich protein site, *J. Biol. Inorg. Chem.*, 14 (2009) 163–165.
- [432] R. Mandal, X.F. Li, Top-down characterization of proteins and drug-protein complexes using nanoelectrospray tandem mass spectrometry, *Rapid Commun.*

- Mass Spectrom., 20 (2006) 48–52.
- [433] C.G. Hartinger, Y.O. Tsybin, J. Fuchser, P.J. Dyson, Characterization of platinum anticancer drug protein-binding sites using a top-down mass spectrometric approach, *Inorg. Chem.*, 47 (2008) 17–19.
- [434] J.S. Becker, N. Jakubowski, The synergy of elemental and biomolecular mass spectrometry: new analytical strategies in life sciences, *Chem. Soc. Rev.*, 38 (2009) 1969–1983.
- [435] M. Montes-Bayón, K. DeNicola, J.A. Caruso, Liquid chromatography-inductively coupled plasma mass spectrometry, *J. Chromatogr. A*, 1000 (2003) 457–476.
- [436] D. Schaumlöffel, J.R. Encinar, R. Łobiński, Development of a Sheathless Interface between Reversed-Phase Capillary HPLC and ICPMS via a Microflow Total Consumption Nebulizer for Selenopeptide Mapping, *Anal. Chem.*, 75 (2003) 6837–6842.
- [437] D. Esteban-Fernández, B. Cañas, I. Pizarro, M.A. Palacios, M.M. Gómez-Gómez, SEC-ICP-MS and ESI-MS as tools to study the interaction between cisplatin and cytosolic biomolecules, *J. Anal. At. Spectrom.*, 22 (2007) 1113.
- [438] D. Esteban-Fernández, M.M. Gómez-Gómez, B. Cañas, J.M. Verdaguer, R. Ramírez, M. a. Palacios, Speciation analysis of platinum antitumoral drugs in impacted tissues, *Talanta*, 72 (2007) 768–773.
- [439] M. Groessl, M. Terenghi, A. Casini, L. Elviri, R. Lobinski, P.J. Dyson, Reactivity of anticancer metallodrugs with serum proteins: new insights from size exclusion chromatography-ICP-MS and ESI-MS, *J. Anal. At. Spectrom.*, 25 (2010) 305–313.
- [440] D. García Sar, M. Montes-Bayón, E. Blanco González, L.M. Sierra, L. Aguado, M.A. Comendador, G. Koellensperger, S. Hann, A. Sanz-Medel, Quantitative profiling of in vivo generated cisplatin-DNA adducts using different isotope dilution strategies, *Anal. Chem.*, 81 (2009) 9553–9560.
- [441] Y. Nygren, P. Hemstroem, C. Astot, P. Naredi, E. Bjoern, Hydrophilic interaction liquid chromatography (HILIC) coupled to inductively coupled plasma mass spectrometry (ICPMS) utilizing a mobile phase with a low-volatile organic modifier for the determination of cisplatin, and its monohydrolyzed metabolite, *J. Anal. At. Spectrom.*, 23 (2008) 948–954.
- [442] J.L. Neilsen, A. Abildtrup, J. Christensen, P. Watson, A. Cox, C.W. McLeod, Laser ablation inductively coupled plasma-mass spectrometry in combination with gel electrophoresis: a new strategy for speciation of metal binding serum proteins, *Spectrochim. Acta Part B*, 53 (1998) 339–345.